

DIE WIRKUNG ESSENTIELLER FETTSÄUREN AUF DIE AKTIVITÄT
UND DEN INTRAZELLULÄREN TRANSPORT
DER PHOSPHOLIPASE D IN COS-1- UND C2-ZELLEN

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin Anja Gemeinhardt
geboren am 07. Mai 1978 in Leipzig

Gutachter der Dissertation:

1. Gutachter: Prof. Dr. Johannes Wöstemeyer (Jena)
2. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Fuhrmann (Leipzig)
3. Gutachter: Prof. Dr. Michael O. Hottiger (Zürich)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.12.2008

Das Erfolgreiche beginnt
mit der detaillierten Ausarbeitung der Idee.

Otto Herz

Dissertation	I
1 Einleitung	1
1.1 Hintergrund der Arbeit	1
1.2 Phospholipasen	2
1.2.1 Phospholipase D	3
1.2.1.1 PLD katalysiert die Transphosphatidylierung	4
1.2.1.2 PLD-Isoformen und ihre Struktur	5
1.2.1.3 Regulation der PLD-Aktivität	8
1.2.1.4 Lokalisation der PLD-Isoformen in der Zelle	14
1.2.1.5 Funktionen der PLD	17
1.3 Fettsäuren	18
1.3.1 Ungesättigte und essentielle Fettsäuren	19
1.3.1.1 Stoffwechsel der n3- und n6-PUFA	21
1.3.1.2 Bedeutung ungesättigter Fettsäuren für zelluläre Membranen	22
1.3.1.3 Bedeutung ungesättigter Fettsäuren für das Immunsystem	23
1.3.1.4 Bedeutung ungesättigter Fettsäuren für die Genexpression	26
1.3.1.5 Ungesättigte Fettsäuren und PLD	27
1.3.1.6 Ungesättigte Fettsäuren und Canine Atopische Dermatitis (CAD)	27
1.4 Mastoparan	28
1.5 Ziele der Arbeit	30
2 Material und Methoden	32
2.1 Materialien	32
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	32
2.1.2 Geräte	32
2.1.3 Chemikalien	34
2.1.3.1 Puffer / Lösungen	36
2.1.3.2 Medien	37
2.1.3.3 Restriktionsenzyme	38
2.1.3.4 Antikörper	38
2.1.3.5 Kits	38
2.1.3.6 Organismen und Plasmide	39
2.1.4 Verwendete Software	40
2.2 Methoden	40
2.2.1 Herstellung kompetenter Zellen von <i>Escherichia coli</i> HB101	40
2.2.2 Transformation der kompetenten Zellen zur Vervielfältigung der Plasmid-DNA	41
2.2.3 Übernachtskulturen für die Plasmidisolierung	41
2.2.4 Plasmidisolierung im kleinen Maßstab	41
2.2.5 Restriktion der Plasmid-DNA	42
2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese	43
2.2.7 Plasmidisolierung im großen Maßstab	43
2.2.8 Phenol-Chloroform-Extraktion	44
2.2.9 DNA-Konzentrationsbestimmung	44
2.2.10 Zellkultur	45
2.2.10.1 Kultivierung der adhärenz Zellen COS-1	45
2.2.10.2 Kultivierung der caninen Suspensionszelllinie C2	45
2.2.11 Mykoplasmenachweis mit dem Venor®GeM Mycoplasma Detection Kit	46
2.2.12 Fettsäuresupplementierung der Zellkulturmedien	47
2.2.13 Fettsäurenbestimmung	48
2.2.14 Transfektion der COS-1-Zellen mit DEAE-Dextran	49
2.2.15 Konfokale Lasermikroskopie	50
2.2.16 Immunpräzipitation transfizierter Zellen	50

2.2.17	SDS-PAGE	51
2.2.18	PLD-Assay (modifiziert nach Sarri <i>et al.</i> 2003)	52
2.2.19	Dünnschichtchromatographie	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Fettsäurezusammensetzung der untersuchten Zelllinien	53
3.1.1	Fettsäurenmuster bei COS-1-Zellen	53
3.1.2	Fettsäurenmuster bei C2-Zellen	55
3.2	Intrazelluläre Lokalisation der PLD-Isoformen unter dem Einfluss von Mastoparan und verschiedenen Fettsäuresupplementen	57
3.2.1	Intrazelluläre Lokalisation der PLD bei im Grundmedium kultivierten COS-1	57
3.2.1.1	Lokalisation von PLD1 bei im Grundmedium kultivierten COS-1	58
3.2.1.2	Lokalisation von PLD2 bei im Grundmedium kultivierten COS-1	60
3.2.2	Einfluss von Ethanol auf die PLD-Lokalisation und -Expression	61
3.2.3	Intrazelluläre Lokalisation der PLD in COS-1-Zellen unter dem Einfluss essentieller Fettsäuren	63
3.2.3.1	Lokalisation von PLD1 in COS-1 unter Linolsäureeinfluss	63
3.2.3.2	Lokalisation von PLD2 in COS-1 unter Linolsäureeinfluss	64
3.2.3.3	Lokalisation von PLD1 in COS-1 unter α -Linolensäureeinfluss	64
3.2.3.4	Lokalisation von PLD2 in COS-1 unter α -Linolensäureeinfluss	66
3.3	Einfluss der Fettsäuresupplementierung auf die enzymatische Aktivität der PLD	66
3.3.1	PLD-Aktivität in COS-1-Zellen	66
3.3.2	PLD-Aktivität in C2-Zellen	68
4	Diskussion	70
4.1	Fettsäurezusammensetzung der COS-1- und C2-Zellen	71
4.1.1	Änderung des Fettsäurenusters der Zellen durch die Supplementierung mit ALA und LA	73
4.1.1.1	Einbau und Metabolisierung der supplementierten Fettsäuren in COS-1-Zellen	73
4.1.1.2	Einbau und Metabolisierung der supplementierten Fettsäuren in C2-Zellen	77
4.1.1.3	Vergleich des Einbaus und der Metabolisierung von PUFA bei COS-1- und C2-Zellen	80
4.2	Einfluss von Mastoparan und unterschiedlichen Fettsäuresupplementierungen auf PLD	81
4.2.1	Einfluss von Mastoparan und unterschiedlichen Fettsäuresupplementierungen auf die intrazelluläre Lokalisation von PLD1 und PLD2	81
4.2.2	Einfluss von Mastoparan und Fettsäuresupplementierung auf die enzymatische Aktivität der PLD	85
4.3	Fazit und Ausblick	90
5	Zusammenfassung	91
6	Summary	93
7	Literatur	95
8	Lebenslauf	i
9	Selbständigkeitserklärung	ii
10	Ehrenwörtliche Erklärung	iii
11	Danksagung	iv
12	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	vi
12.1	Publikationen	vi
12.2	Vorträge	vi
12.3	Buchbeiträge	vi
12.4	Poster	vi

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure, C20:4n6
AG	Arachidonylglycol
ALA	α -Linolensäure (engl.: <i>α-linolenic acid</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	engl.: <i>ADP-ribosylation factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BFA	Brefeldin A
BHK	Zelllinie aus Nierengewebe von Hamstern (engl.: <i>baby hamster kidney</i>)
bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius
C2	canine Mastozytom-Zelllinie
Ca	Calcium
CHO	Hamster-Ovarienzellen (engl.: <i>chinese hamster ovary</i>)
Ci	Curie
cm	Zentimeter
ConA	Concanavalin A
COS	Zelllinie aus Nierengewebe der Grünen Meerkatze (engl.: <i>African green monkey</i> , lat. <i>Cercopithecus aethiops</i>)
COX	Cyclooxygenase
DAG	Diacylglycerol
DEH	Zellkulturmedium (DMEM/HAM's F12)
DGLA	Dihomo- γ -Linolensäure, C20:3n6
DHA	Docosahexaensäure, C22:6n3
DMEM	Zellkulturmedium (engl.: <i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	engl.: <i>epidermal growth factor</i>
EGFP	verbesserte Variante des grün fluoreszierenden Proteins (engl.: <i>enhanced green fluorescent protein</i>)
EFA	essentielle Fettsäure (engl.: <i>essential fatty acid</i>)
EPA	Eicosapentaensäure, C20:5n3
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAME	Fettsäuren-Methylester (engl.: <i>fatty acid methylester</i>)
fM	Femtomol
FMLP	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin

g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
Gew.-%	Gewichtsprozent
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl.: <i>green fluorescent protein</i>)
GLA	γ -Linolensäure, C18:3n6
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPR	G-Protein-Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HeLa	humane Zervixkarzinomzellen
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HL60	humane promyelotische Leukämiezellen
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
kDa	kilo-Dalton
LA	Linolensäure (engl.: <i>linoleic acid</i>)
LOX	Lipoxygenase
LPA	Lysophosphatidsäure
LT	Leukotrien
mA	Milliampère
mAb	Maus-Antikörper (engl.: <i>mouse antibody</i>)
mbar	Millibar
MEM	engl.: <i>minimal essential medium</i>
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
MW	Mittelwert
NF κ B	engl.: <i>nuclear faktor κB</i> , proinflammatorischer Transkriptionsfaktor
ng	Nanogramm
nmol	nanomolar
NRK	Ratten-Nierenzellen
PA	Phosphatidsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Protein A-Sepharose
PBMC	engl.: <i>peripheral blood mononuclear cells</i> , Monozytenzelllinie

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PBut	Phosphatidylbutanol
PC	Phosphatidylcholin
PEt	Phosphatidylethanol
PG	Prostaglandin
PGDF	Thrombozyten-abgeleiteter Wachstumsfaktor (engl.: <i>platelet-derived growth factor</i>)
PH	engl.: <i>pleckstrin homology domain</i>
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PIP5K	Phosphatidylinositolphosphat-5-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLA	Phospholipase A
PLB	Phospholipase B
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
pm	picomol
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PPAR	Peroxisom-Proliferator aktivierter Rezeptor (engl.: <i>peroxisome proliferator activated receptor</i>)
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren (engl.: <i>polyunsaturated fatty acids</i>)
PX	engl. : <i>phox consensus sequence</i>
RBL-2H3	engl.: <i>rat blastocytoma leukemia</i> , Rattenmastzelllinie
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>rounds per minute</i>)
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SD	Standardabweichung (engl.: <i>standard difference</i>)
3T3 Li	Albino-Maus-Fibroblasten
TAE	Tris-Acetat EDTA
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TX	Thromboxan
U937	humane histiozytäre Lymphomzellen
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt

Vero	Zelllinie aus Nierengewebe der Grünen Meerkatze (engl.: <i>African green monkey</i> , lat. <i>Cercopithecus aethiops</i>)
vol.	Volumen
vs.	<i>versus</i> (gegenüber)
3Y1	Ratten-Fibroblasten-Zelllinie
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 *Hintergrund der Arbeit*

In den letzten Jahrzehnten konnte eine starke Zunahme der atopischen Dermatitis des Hundes (Canine Atopische Dermatitis, CAD) beobachtet werden. Auch bei Menschen der westlichen Industrienationen wird diese Tendenz bei dem vergleichbaren Krankheitsbild (Neurodermitis) sichtbar. Verantwortlich hierfür sind genetische und umweltbedingte Faktoren. Auslöser der Erkrankung sind unter anderem Hausstaubmilben und Pollen, auf die das Immunsystem der betroffenen Patienten mit extremem Juckreiz und Entzündungserscheinungen reagiert.

Die Allergenvermeidung steht hier aus therapeutischer Sicht an erster Stelle. Sie ist in den meisten Fällen allerdings nicht praktikabel, weshalb man auf spezifische Immuntherapie oder symptomatische Behandlungen mit Antihistaminika, Hemmstoffen der Leukotrien- oder Interleukinsynthese, Phosphodiesteraseinhibitoren, Cyclosporin oder Glukokortikoiden zurückgreift. Allerdings haben diese Substanzen oft starke und vielfältige Nebenwirkungen. Aus diesem Grund wird seit einigen Jahren vermehrt nach Alternativen gesucht. Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Gabe mehrfach ungesättigter n3- und n6-Fettsäuren eine positive Wirkung auf das klinische Bild der CAD hat. Bei Untersuchungen des Fettsäurenusters atopischer Patienten wurde ein gestörter Metabolismus der essentiellen Fettsäuren Linol- und α -Linolensäure beobachtet. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Umwandlung dieser essentiellen Fettsäuren in ihre längerkettigen und mehrfach ungesättigten Metabolite in nur unzureichendem Maße erfolgt. Da genannte Fettsäuren an der Bildung und Freisetzung wichtiger Entzündungsmediatoren (wie z. B. Prostaglandinen) beteiligt sind, könnten veränderte Fettsäurenmuster an der Überreaktion des Immunsystems atopischer Patienten beteiligt sein.

Das Immunsystem reagiert mit Hilfe von Mastzellen auf den Kontakt mit Allergenen. Mastzellen sind vornehmlich im Gewebe von Haut, Lunge und Darm lokalisiert und stehen so mit der Umwelt in direktem Kontakt. Sie besitzen eine große Menge vorgefertigter Entzündungsmediatoren, können daher sehr schnell durch deren Exozytose auf den Allergenkontakt reagieren und spielen so eine entscheidende Rolle bei der CAD. In diesem Zusammenhang ist die Phospholipase D (PLD) besonders wichtig. Sie ist an bedeutenden zellulären Prozessen, wie dem Aufbau von Zellmembranen, der Exozytose und an sekretorischen Transportprozessen beteiligt.

Diese Arbeit soll einen Beitrag zur Erforschung der Mechanismen leisten, die zwischen der Stimulation der Zellen und der Freisetzung der Entzündungsmediatoren liegen. In diesem Zusammenhang soll geklärt werden, ob eine Veränderung des Fettsäurenusters durch die Supplementierung des Zellkulturmediums mit den essentiellen Fettsäuren Linol- und α -Linolensäure einen Einfluss auf die Aktivität und die intrazelluläre Lokalisation der PLD hat.

1.2 Phospholipasen

Die zellulären Membranphospholipide unterliegen einem kontinuierlichen Umbau. Phospholipasen spielen dabei eine wichtige Rolle. Sie gehören zur Enzymklasse der Hydrolasen und katalysieren in Abhängigkeit von ihrer Spezifität die Spaltung der Esterbindungen in Glycerophospholipiden. Die Phospholipasen A₁, A₂ und B (PLA₁, PLA₂, PLB) hydrolysieren die Esterbindungen am ersten oder zweiten C-Atom des Glycerins. Die Phospholipasen C (PLC) und D (PLD) spalten jeweils eine der Phosphodiesterbindungen der Kopfgruppe.

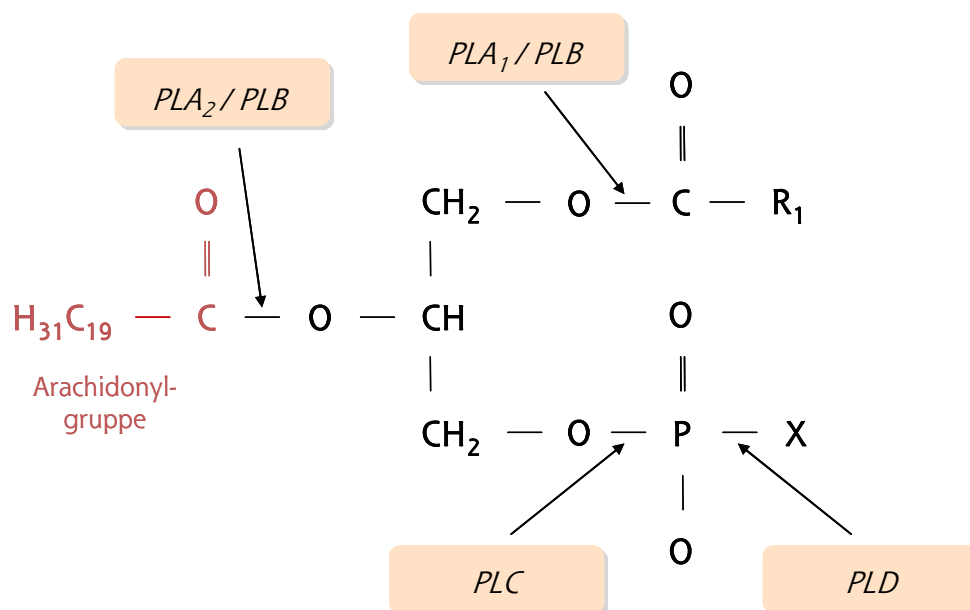


Abb. 1: Die Wirkungsspezifität der Phospholipasen.

Zu den Funktionen der Phospholipasen gehört der Abbau extra- und intrazellulärer Phospholipide in Verbindung mit Membransynthese, –abbau und Biosynthese von Zellorganellen. Phospholipasen sind als Komponenten der intrazellulären Signalübertragung auch an der Bildung von *second messengern* beteiligt. Beispielsweise hydrolysiert die PLA₂ Phospholipide, die Arachidonsäure (AA) enthalten und setzt so AA für die Synthese von Prostaglandinen frei. PLC dagegen katalysiert die Hydrolyse von Phospholipiden mit Inositol-Kopfgruppen und erzeugt somit *second messenger* (Inositolphosphate und Diglyceride), die den intrazellu-

lären Ca^{2+} -Spiegel und die Proteinkinase C (PKC) kontrollieren (Divecha *and* Irvine, 1995; Nishizuka, 1992; Rhee *and* Choi, 1992).

1.2.1 Phospholipase D

Die Phospholipase D (E.C.3.1.4.4.) ist in Säugerzellen und –geweben weit verbreitet und als rezeptorreguliertes Signalenzym bekannt, das eine Reihe zellulärer Funktionen beeinflusst. So ist die PLD am Aufbau der Zellmembranen, an der Exozytose, der Sekretion von Vesikeln, der Phagozytose und der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt (Cummings *et al.*, 2002).

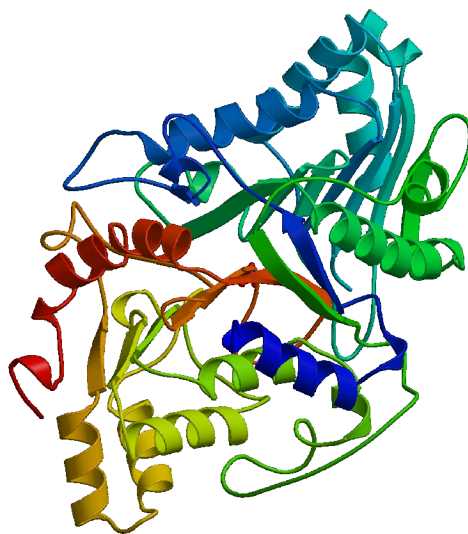


Abb. 2: Schematische Proteinstruktur der Phospholipase D. (Leiros *et al.*, 2000)

Die PLD katalysiert die Hydrolyse des Hauptmembranphospholipids Phosphatidylcholin (PC) zu Phosphatidsäure (PA) und Cholin (Billah *and* Anthes, 1990). PA kann vielfältige Rollen in der zellulären Funktion spielen. Sie kann an Signaltransduktionsvorgängen wie der Aktivierung der PIP_2 -Kinase (Typ I) beteiligt sein (Jenkins *et al.*, 1994) oder die Rekrutierung verschiedener Proteine beeinflussen. Die Produktion von PA spielt auch eine wichtige Rolle bei Vesikeltransport, Endozytose und Sekretion (Jones *et al.*, 1999). PA wirkt als *second messenger* und kann in andere biologisch aktive Lipide, wie z. B. Lysophosphatidsäure (LPA) und Diacylglycerol (DAG) umgewandelt werden (Liscovitch *et al.*, 2000). DAG ist ein gut charakterisierter endogener Aktivator der Proteinkinase C (PKC). Auch das durch die PLD-Aktivität entstehende Cholin besitzt biologische Funktionen. So kann es zu Phosphocholin, einem Regulator der Zellproliferation, umgewandelt werden (Hernandez-Alcoceba *et al.*, 1997). Die hydrolytische Spaltung des PC durch die PLD führt über einen Anstieg wichtiger *second messenger* zur Steuerung verschiedenster Zellfunktionen. Dazu gehören außer PA,

LPA und DAG auch 2-Arachidonylglycol (2-AG) und Phosphocholin (Cummings *et al.*, 2002). Neben PC können auch andere Membranphospholipide wie Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin oder Phosphatidylinositol als Substrate für die PLD dienen (Morris *et al.*, 1997).

1.2.1.1 PLD katalysiert die Transphosphatidylierung

Die PLD ist eine Phospholipidesterase. Die Besonderheit dieses Enzyms ist, dass es die Transphosphatidylierungsreaktion (Abb. 3) katalysieren kann, indem es sich kurzkettige primäre Alkohole als Phosphatidylgruppenakzeptoren zunutze macht (Morris *et al.*, 1997).

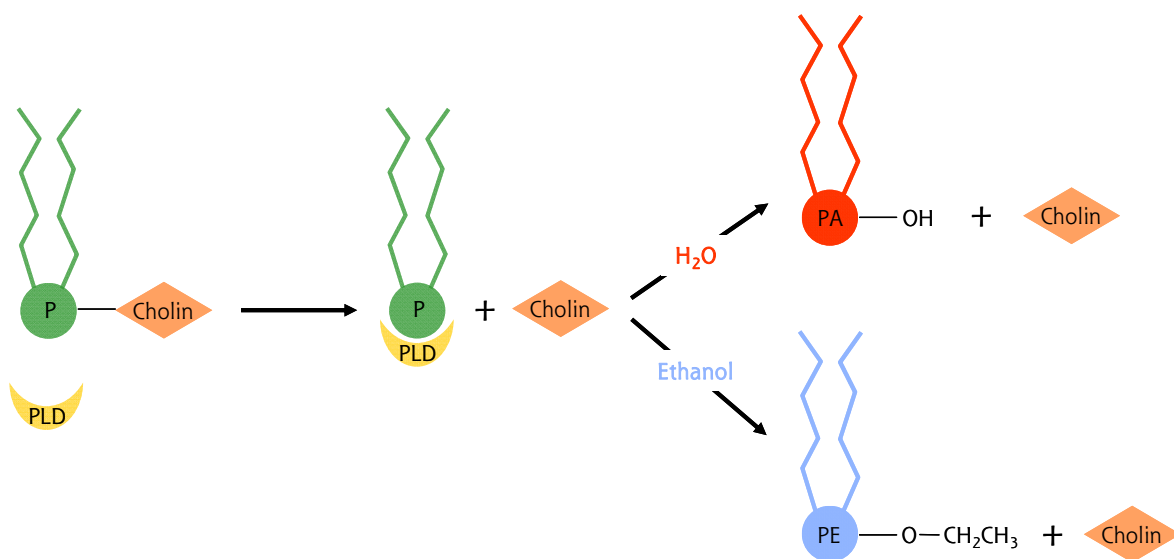


Abb. 3: Die hydrolytische Spaltung von Phosphatidylcholin (PC) in Phosphatidsäure (PA) und Cholin durch PLD. Im ersten Teil der Reaktion bindet PLD an PC und bewirkt so die Bildung eines PA-PLD-Zwischenproduktes durch die kovalente Verknüpfung von PA an Histiidin und den Verlust der Cholin-Kopfgruppe. Im zweiten Teil der Reaktion können entweder Wasser oder ein primärer Alkohol (z. B. Ethanol) als Nukleophil dienen. In der Gegenwart von Wasser ist PA das Reaktionsprodukt, während mit Ethanol das metabolisch stabile Phosphatidylethanol (PE) gebildet wird. P – Phosphatrest, PLD – Phospholipase D, PA – Phosphatidsäure (engl.: *phosphatidic acid*), PE – Phosphatidylethanol. (Modifiziert nach Cockcroft *et al.*, 2002).

Es wird vermutet, dass die PLD aus einer Superfamilie von Alkohol-Transphosphatidylasen entstand und hier wahrscheinlich der Ursprung dieses Merkmals zu suchen ist (Frohman *et al.*, 1999). Die Transphosphatidylierung ist eine Konkurrenzreaktion zur Hydrolyse, eine Umesterung, bei welcher der Phosphatidylrest in Anwesenheit eines primären Alkohols, z. B. Ethanol, auf diesen Alkohol anstelle von Wasser übertragen wird. Dabei entsteht ein Phosphatidylalkohol (z. B. Phosphatidylethanol). Primäre Alkohole sind sehr gute Substrate für die PLD und werden gegenüber Wasser bevorzugt. Das primäre PLD-Produkt PA wird für

die Bildung von DAG sehr schnell dephosphoryliert. Die durch die Transphosphatidylierung gebildeten Phosphatidylalkohole dienen nicht als Substrate für Phosphatidsäurephosphatasen, die deren Dephosphorylierung katalysieren. Durch die Transphosphatidylierungsreaktion ist es möglich, die PLD-Aktivität *in vitro* zu untersuchen. Bei dieser Reaktion auftretende Effekte können so der PLD, und nicht dem durch die PLD gebildeten *second messenger* PA, zugeordnet werden (Morris *et al.*, 1997).

1.2.1.2 PLD-Isoformen und ihre Struktur

Die PLD-Aktivität wurde zuerst bei Pflanzen entdeckt. Die PLD war das erste PC-hydrolysierende Enzym, dessen genomische Sequenz gereinigt und erfolgreich kloniert werden konnte (Wang *et al.*, 1994). Nach der Klonierung des pflanzlichen PLD-Gens stellte man fest, dass es Sequenz-Homologien zum Hefe-Sporulationsgen *SPO14* gab, was zu der Überlegung führte, dass *SPO14* die Hefe-PLD sein könnte (Rose *et al.*, 1995). Die Verfügbarkeit dieser beiden Sequenzen eröffnete den Weg für die Klonierung der Säuger-PLD-Gene (Colley *et al.*, 1997; Hammond *et al.*, 1995; Hammond *et al.*, 1997).

Von der PLD sind zwei Isoformen bekannt und kloniert worden, PLD1 und PLD2 (Colley *et al.*, 1997; Hammond *et al.*, 1995; Steed *et al.*, 1998). Zusammen mit den Pflanzen- und Hefegenen umfassen sie eine neue Genfamilie (Cockcroft, 2001). Ihre begrenzten, aber signifikanten Übereinstimmungen definieren eine Reihe charakteristischer, hoch konservierter Sequenzmotive (Morris *et al.*, 1996). So haben alle Mitglieder der PLD-Superfamilie zwei HKD-Motive (Cockcroft, 2001). Diese werden im Abschnitt 1.2.1.2.1 näher erläutert. Andere hoch konservierte Regionen der PLD-Gene sind die *phox consensus*-Sequenz (PX), die *plekstrin homology*-Domäne (PH) (siehe 1.2.1.2.2) und die Bindungsstelle für PIP₂ (Jenkins and Frohman, 2005).

Von PLD1 gibt es zwei Spleiß-Varianten, PLD1a und PLD1b, die sich durch die Insertion von 38 Aminosäuren in PLD1a unterscheiden (Hammond *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1997). Die PLD1-cDNA codiert für ein Protein aus 1074 Aminosäuren (Hammond *et al.*, 1995). PLD2 ist ein 106 kDa-Protein mit einer Länge von 933 Aminosäuren. Beide Isoformen sind in ihrer Aminosäure-Zusammensetzung zu 55 % identisch (Cockcroft, 2001). Sie unterscheiden sich hauptsächlich in ihren N- und C-Termini. PLD1 hat nach dem ersten HKD-Motiv eine zusätzliche *loop*-Region, bestehend aus 116 Aminosäuren, die bei PLD2 oder den PLDs niedriger Organismen nicht vorkommt (Colley *et al.*, 1997; Hammond *et al.*, 1995). Es wird diskutiert, dass diese Region die Quelle der regulatorischen Eigenschaften ist, die PLD1 von PLD2 unterscheidet. Sie scheint allerdings entbehrlich zu sein, da sie dem alternativen Spleißen unterliegt (Sung *et al.*, 1999b) und die Aktivität, Regulation (Colley *et al.*, 1997; Hammond *et*

al., 1997; Katayama *et al.*, 1998) und subzelluläre Lokalisation von PLD1 nicht zu beeinflussen scheint. Sie kann sowohl aus PLD1 entfernt, als auch in PLD2 eingefügt werden, ohne die Aktivität maßgeblich zu beeinträchtigen (Sung *et al.*, 1999b; Sung *et al.*, 1999a).

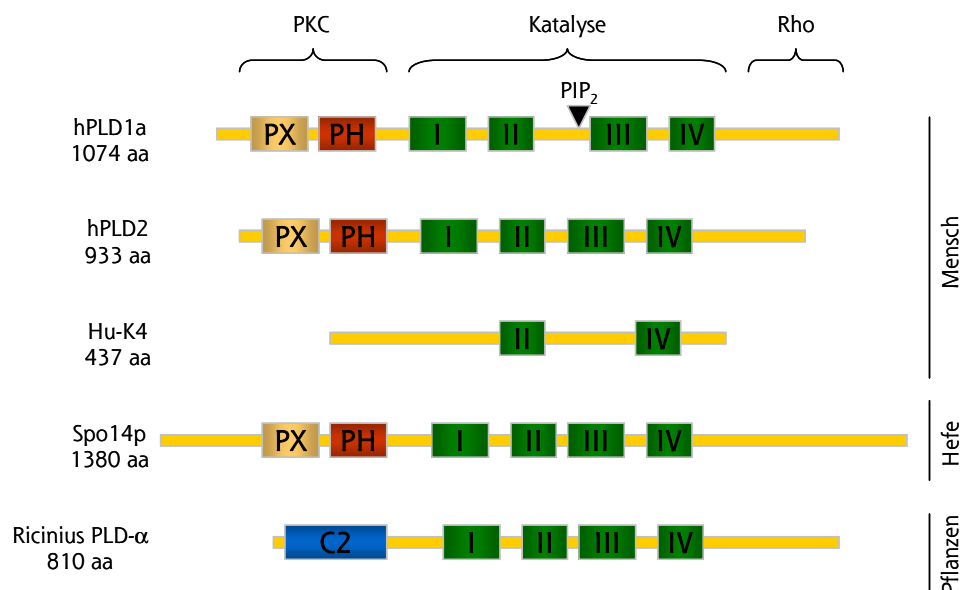


Abb. 4: Schematische Darstellung der Domänen-Struktur der humanen PLD1-, PLD2- und Hu-K4-Proteine und ihrer Beziehung zur Pflanzen- und Hefe-PLD. Gezeigt sind Regionen konservierter Sequenzen. PX – *phox consensus*-Sequenz, PH – *plekstrin homology*-Domäne, C2 – Calcium- und Phospholipid-bindende Domäne, Motive I bis IV – Regionen konservierter Domänen bei allen PLD-Isozymen. Die Motive II und IV kommen auch in Hu-K4, einem humanen Homolog des K4L-Proteins des Vaccinia-Virus und Typ II-Transmembranprotein (Munck *et al.*, 2005), vor. (Nach Cockcroft, 2001).

1.2.1.2.1 Das HKD-Motiv

Das katalytische Zentrum der eukaryotischen PLD-Enzyme besteht aus vier konservierten Regionen (McDermott *et al.*, 2004). Sie werden mit den römischen Zahlen I – IV bezeichnet. Am höchsten konserviert sind die Domänen II und IV. Diese beiden Domänen enthalten jeweils ein HKD-Motiv (Hammond *et al.*, 1995; Koonin, 1996; Ponting and Kerr, 1996). Die Bezeichnung HKD stammt vom Motiv HxxxxKxD/E, wobei H für Histidin, K für Lysin, D für Asparaginsäure, E für Glutaminsäure und x für andere Aminosäuren stehen (Jenkins and Frohman, 2005). Beide HKD-Motive spielen für die Aktivität des Enzyms sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* eine entscheidende Rolle (Sung *et al.*, 1997). Das HKD-Motiv ist die am höchsten konservierte Domäne dieser Enzym-Superfamilie (Frohman *et al.*, 1999). Das doppelte Vorkommen der HKD-Motive und das wiederholte Auftreten von vier kurzen Motiven (zwischen Domäne I und II und zwischen Domäne III und IV) lässt die Schlussfolgerung zu, dass

die eukaryotischen PLD-Gene das Resultat einer Genverdopplung sein könnten (Ponting *and* Kerr, 1996). Es ist anzunehmen, dass das HKD-Motiv direkt in die Katalyse involviert ist (Frohman *et al.*, 1999). Untermuert wird diese Vermutung durch die Einführung von Punktmutationen in die PLD unterschiedlicher Spezies. Dabei konnte deutlich gemacht werden, dass die genannten Aminosäuren eine entscheidende Rolle für die Katalyse *in vitro* und die PLD-Funktion *in vivo* spielen. Für die Aktivität der PLD ist es notwendig, dass beide HKD-Domänen intakt sind (Sung *et al.*, 1997). Erste Strukturanalysen einer bakteriellen PLD (54 kDa) bestätigten, dass das HKD-Motiv als Dimer agiert und Phosphodiester binden kann (Leiros *et al.*, 2000). Dasselbe gilt auch für die Säuger-PLD, bei der zwei HKD-Motive assoziiert sind und ein katalytisches Zentrum bilden (Xie *et al.*, 2000).

1.2.1.2.2 PX- und PH-Domäne

Die PLDs von Menschen, Hefen und Nematoden enthalten eine N-terminale Region, die als *phox consensus*-Sequenz (PX-Domäne) identifiziert wurde (Liscovitch *et al.*, 2000; Ponting, 1996). PX-Domänen vermitteln eine Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen (Ponting, 1996) oder binden Phosphatidylinositolphosphat (PIP) (Xu *et al.*, 2001). Über ihre Funktion ist bisher wenig bekannt. PX-Domänen sind in über 100 Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen nachgewiesen worden (Ellson *et al.*, 2002) und haben eine Länge von ca. 120 Aminosäuren. Sequenzvergleiche haben gezeigt, dass sie einige gut konservierte Regionen beinhalten (Ponting, 1996). Eine Punktmutation bei PLD1 in diesem Bereich führte zu der Annahme, dass die PX-Domäne für die *in vitro*-Katalyse nicht essentiell ist. PX-Mutanten wiesen *in vivo* eine höhere, durch PMA stimulierbare, Grundaktivität auf als das Wildtypprotein (Sung *et al.*, 1999b). Die PX-Domäne scheint an der Bindung von Regulationsfaktoren beteiligt zu sein, welche die Aktivierung und/oder Translokation in Interaktion mit Membranen fördern. Des Weiteren wird vermutet, dass die PX-Domäne von PLD1 Phosphatidylinositol-5-Phosphat binden und das Targeting des Proteins an endozytotische Vesikel vermitteln könnte (Du *et al.*, 2003).

PH-Domänen dagegen sind strukturelle Protein-Module mit einer Länge von etwa 100 Aminosäuren (Maffucci *and* Falasca, 2001). Analysen mit Deletionsmutanten von PLD1 und PLD2 haben gezeigt, dass die PH-Domäne für die enzymatische Aktivität nicht unbedingt nötig ist. Auch wird die Abhängigkeit des Enzyms von PIP₂ durch Deletion der PH-Domäne nicht beeinflusst (Sung *et al.*, 1999b; Sung *et al.*, 1999a). Allerdings führten Punktmutationen oder Basendeletionen in diesem Bereich zu einer Mislokation des Enzyms. Womöglich ist die PH-Domäne für das initiale Membran-Targeting verantwortlich (Sugars *et al.*, 2002). Demgegenüber zeigte eine andere Arbeit, dass die Aktivität der PLD1b durch Punktmutationen in

der PH-Domäne vermindert wurde (Hodgkin *et al.*, 2000).

1.2.1.2.3 Expression der PLD-Isoformen

Eine Reihe von Untersuchungen der biochemischen Aktivität der PLD hat gezeigt, dass dieses Protein in den meisten Zellen exprimiert wird. Infolge des Fehlens hochaffiner Antikörper und des niedrigen Expressionsniveaus dieser Proteine war die Detektion von PLD1 und PLD2 mit Antikörpern bisher aber nur teilweise erfolgreich (Cockcroft, 2001).

Ein alternativer Weg, die Expression endogener PLD-Isoformen zu detektieren, war die Messung auf mRNA-Ebene. Dabei fand man heraus, dass die Niveaus von PLD1 und PLD2 innerhalb primärer Gewebe und zwischen einzelnen Zelllinien variieren; in den meisten Fällen werden aber beide Isozyme von den Zellen exprimiert (Gibbs *and* Meier, 2000; Meier *et al.*, 1999). Die Expression der mRNA beider Isozyme kann sowohl in primären als auch in kultivierten Zellen auf Transkriptionsebene durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren reguliert werden (Cockcroft, 2001). Bei HL60-Zellen (engl.: *human acute myeloid leukemia*) beispielsweise führt die Differenzierung zu einem enormen Anstieg der PLD1- und PLD2-Expression (El Marjou *et al.*, 2000; Ohguchi *et al.*, 1999).

1.2.1.3 Regulation der PLD-Aktivität

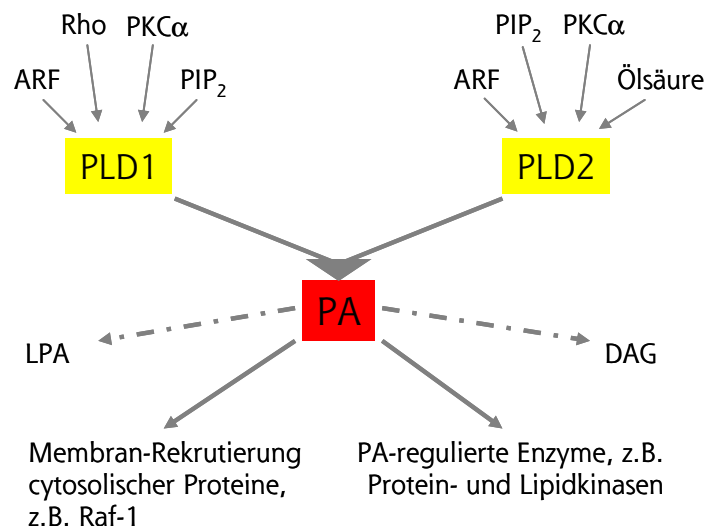


Abb. 5: **Direkte Aktivatoren von PLD1 und PLD2 und die potentielle Funktion von PA.** Die unterbrochenen Linien bezeichnen Möglichkeiten des weiteren Metabolismus von PA. ARF – *ADP-ribosylation factor*, PKCα – Proteinkinase Cα, PIP₂ – Phosphatidyinositol-4,5-bisphosphat, PLD – Phospholipase D, LPA – Lysophosphatidsäure (engl.: *lysophosphatidic acid*), PA – Phosphatidsäure (engl.: *phosphatidic acid*), DAG – Diacylglycerol. (Nach Cockcroft, 2001).

Die PLD-Aktivität unterliegt verschiedenen Regulationsmöglichkeiten. Dazu gehören unter anderem Phosphoinositole, Fettsäuren, GTP-bindende Proteine, Proteinkinase C, Ca^{2+} und Phosphorylierung. Ein Zusammenspiel dieser Faktoren reguliert die Aktivität der PLD in synergistischer oder antagonistischer Art und Weise (McDermott *et al.*, 2004).

1.2.1.3.1 Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂)

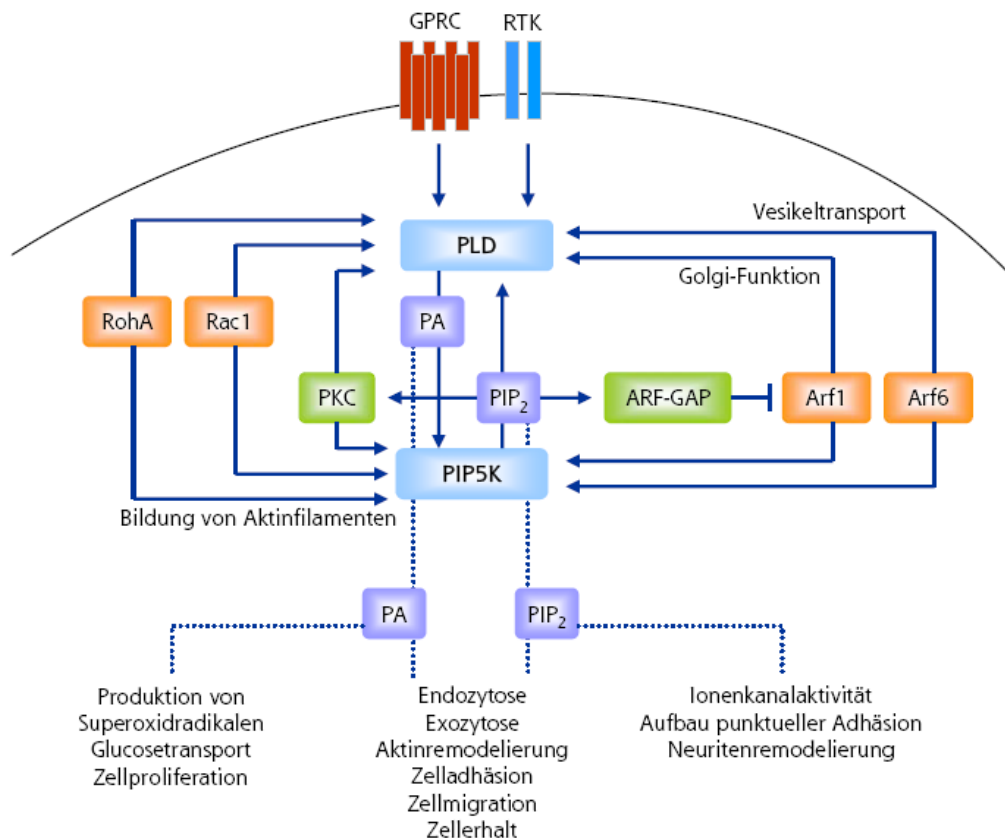


Abb. 6: Regulation und zelluläre Bedeutung von PLD und PIP5K. Die Regulation von PLD und PIP5K durch ARF und Rho-GTPasen ist essentiell für die Regulation des intrazellulären Vesikeltraffickings und der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts. Sowohl die PLD als auch PIP5K werden durch Zelloberflächenrezeptoren und konventionelle PKC-Isoformen stimuliert. Letztere werden nach Rezeptor-induzierter Hydrolyse von PIP₂ durch PLC aktiviert. Von PIP5K stammendes PIP₂ wirkt stimulierend auf die PLD und von der PLD stammendes PA wirkt stimulierend auf PIP5K. Die Aktivierung von ARF-GAPs durch PIP₂ beschleunigt die Inaktivierung der ARF-Proteine und kann die PA- und PIP₂-Synthese beenden. (Nach Oude Weernink *et al.*, 2007). GPCR – G-Protein-gekoppelter Rezeptor (engl.: *G-protein coupled receptor*), RTK – Tyrosinkinase-Rezeptor (engl.: *receptor tyrosin kinase*), RhoA / Rac1 – G-Proteine, PKC – Proteinkinase C, PA – Phosphatidsäure (engl.: *phosphatidic acid*), PLD – Phospholipase D, ARF – ADP-Ribosylierungsfaktor, ARF-GAP – ARF-GDPase-aktivierendes Protein, PIP₂ – Phosphatidylinositolbisphosphat, PIP5K – Phosphatidylinositolphosphat-5-Kinase.

Die Entwicklung von *in vitro*-Untersuchungsmethoden für die PLD-Aktivität veranschaulichte die Notwendigkeit des Vorhandenseins von PIP2 (Brown *et al.*, 1993). Die Säuger-PLDs haben eine Bindungsstelle für PIP2 (Jenkins *and* Frohman, 2005). PIP2 ist ein bedeutender Co-Faktor und allosterischer Regulator für die PLD und beeinflusst in starkem Maße die Aktivität, Membranlokalisation und Rezeptoraktivierung beider PLD-Isoformen (Brown *et al.*, 1993; Hodgkin *et al.*, 2000; Liscovitch *et al.*, 1994; Pertile *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1996b). Die Reduktion von zellulärem PIP2 kann die PLD-Aktivität inhibieren (Oude Weernink *et al.*, 2007). Umgekehrt kann aber die Synthese von PIP2 durch Phosphatidylinositolphosphat-5-Kinase (PIP5K)-Isoformen direkt durch das PLD-Produkt PA stimuliert werden (Jenkins *et al.*, 1994; Moritz *et al.*, 1992; Oude Weernink *et al.*, 2007). Die Aktivität und Lokalisation sowohl der PLD als auch der PIP5K werden von den kleinen GTPasen der ARF- und Rho-Familien kontrolliert. Diese wiederum sind als Regulatoren von Membrantransport- und Aktin-Reorganisation bekannt (Oude Weernink *et al.*, 2007).

Eine Position, die für die PIP2-Regulation von Bedeutung ist, wurde zwischen den Motiven II und III (siehe Abb. 4) identifiziert. Es ist eine einzelne konservierte Region, die als KR-Motiv bezeichnet wird. Sie ist reich an basischen Aminosäuren und oft von aromatischen und aliphatischen Aminosäuren unterbrochen. Mutationsanalysen bei PLD2 an dieser Stelle haben ergeben, dass die PIP2-abhängige Aktivierung verloren geht, obwohl das Enzym normal lokalisiert ist (Sciorra *et al.*, 1999).

1.2.1.3.2 Ölsäure

Die Ölsäure-abhängige PLD unterscheidet sich von der PIP-abhängigen und durch ARF aktivierbaren Form (Massenburg *et al.*, 1994). Sie wurde in der Plasmamembran, dem ER und im Nukleus gefunden (Liscovitch *et al.*, 1999). Man vermutete, dass dieses durch Ölsäure stimulierbare Enzym PLD2 ist, denn von PLD2 war bekannt, dass sie durch ungesättigte Fettsäuren (Ölsäure, Linolensäure und Arachidonsäure) stimuliert werden konnte (Kim *et al.*, 1999b). Untersucht wurde dies unter anderem an murinen leukämischen Lymphozyten (L1210) und humanen histiozytären Lymphom-Zellen (U937). Die U937-Zellen wiesen eine geringe PIP2-abhängige PLD-Aktivität auf, die z. B. durch ARF1 um das Zehnfache erhöht werden konnte. Die L1210-Zellen dagegen hatten eine hohe PIP2-abhängige PLD-Aktivität, die durch Zugabe von ARF1 nicht beeinflusst werden konnte. Die Autoren untersuchten nun die Ölsäure-abhängige PLD-Aktivität in Abwesenheit von PIP2 und ARF1 und fanden heraus, dass die Membranfraktion der L1210-Zellen Ölsäure-stimulierte PLD-Aktivität aufwies. Die U937-Zellen dagegen zeigten keine PLD-Aktivität. Gesättigte Fettsäuren hatten keinen Einfluss auf die Aktivität der PLD2 (Kim *et al.*, 1999b). Andere Arbeiten dagegen gaben an,

dass die menschliche PLD2 nicht durch Ölsäure stimulierbar ist (Lopez *et al.*, 1998). Man vermutet, dass die Ölsäure-aktivierte Form während der Apoptose aktiviert wird (Kasai *et al.*, 1998; Liscovitch *et al.*, 2000).

1.2.1.3.3 *Posttranslationale Modifikation*

Eine wichtige posttranslationale Modifikation von Proteinen ist die Acylierung. Dabei wird Palmitinsäure (oder auch eine andere Fettsäure wie Myristinsäure oder Arachidonsäure) spezifisch an Cysteinreste im Protein gebunden. Eine Palmitoylierung kann während oder nach der Translation stattfinden und dient hauptsächlich dem Transport des Proteins zu den Zellmembranen (Casey, 1995). Die PLD ist palmitoyliert. Diese Modifikation scheint wichtige Konsequenzen für die Regulation und Lokalisation dieses Enzyms zu haben (Manifava *et al.*, 1999). Untersuchungen identifizierten die palmitoylierten Reste als Cystein-240 und -241 in der PH-Domäne (Sugars *et al.*, 1999). Eine Mutation dieser Region *in vivo* resultierte in 50 – 80 % der Aktivität des Wildtyp-Proteins, während *in vitro* die Aktivität des Wildtyps erhalten blieb. Die Mutation führte bei PLD1 dazu, dass sich die Lokalisation des Enzyms von der perinukleären punktförmigen Verteilung im Zytoplasma hin zur Plasmamembran veränderte. Daher wird die Möglichkeit diskutiert, dass PLD1 mehrere Membran-Targeting-Signale besitzt. Das Entfernen der Palmitoylierung könnte ein zusätzliches Signal aktivieren, dass die Lokalisation an der Plasmamembran bestimmt (Sugars *et al.*, 2002). Andere Autoren untersuchten die PLD an Ratten und kamen zu dem Ergebnis, dass die PLD bei einer Mutation dieser Cysteinreste eine geringere Grundaktivität aufwies (Xie *et al.*, 2001). Zudem konnten sie eine höhere Serin- und Threonin-Phosphorylierung sowie eine schwächere Membranassoziiierung feststellen. Die Palmitoylierung stabilisiert die Interaktion der PLD1 mit Membranen und stellt sicher, dass das Protein an die entsprechende Membran gebunden wird. Diese Modifikation wird wahrscheinlich hauptsächlich für die Bindung von PLD1 an die Membran verantwortlich sein (Sugars *et al.*, 2002).

1.2.1.3.4 *ADP-Ribosylierungsfaktor (ARF)*

PLD1 wird durch verschiedene zytosolische Faktoren reguliert. Dazu gehören die kleinen G-Proteine der ARF- und RhoA-Familie und die Proteinkinase C α (Sarri *et al.*, 2003). Einen Unterschied zwischen den Spleiß-Varianten der PLD1 gibt es dabei nicht. Die ARF-Proteine gehören zur Superfamilie der kleinen GTPasen mit einem Molekulargewicht von ca. 20 kDa. Bei Säugern gibt es sechs ARF-Proteine, ARF1 – ARF6. Sie alle besitzen die Fähigkeit, PLD1 zu aktivieren. Sie sind in ihrer Aminosäurezusammensetzung sowohl untereinander als auch zwischen verschiedenen Spezies stark konserviert (Moss *and* Vaughan, 1995). Die

Anlagerung von Myristinsäure an diese Proteine erhöht ihre Wirkung als Aktivatoren und scheint für die Membranassoziation von Bedeutung zu sein (Brown *et al.*, 1993). ARF wurde zuerst als Aktivator der PLD-Aktivität in HL60-Zellen identifiziert (Brown *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1995). ARF aktiviert PLD1 direkt (Hammond *et al.*, 1995) und kann auch PLD2 aktivieren (Lopez *et al.*, 1998; Sung *et al.*, 1999b). Die Verwendung von Brefeldin A (BFA) als ARF-Inhibitor blockierte PLD (Shome *et al.*, 1998). In Untersuchungen dazu wurde eine Ratten-Fibroblasten-Zelllinie mit dem Thrombozyten-abgeleiteten Wachstumsfaktor (PDGF, engl.: *platelet-derived growth factor*) stimuliert, was zu einem starken Anstieg (45 %) der PLD-Aktivität führte. Durch die Behandlung mit PMA wurde die PLD-Aktivität sogar um 78 % erhöht. Wenn aber 10 min vor der Stimulation BFA zugegeben wurde, war die PLD-Aktivität nach PMA signifikant erniedrigt – PDGF zeigte sogar keinen Effekt mehr (Shome *et al.*, 1998).

1.2.1.3.5 *Rho-GTPasen*

Die Familie der Rho-GTPasen gehört ebenfalls zur Superfamilie der kleinen GTPasen mit einem Molekulargewicht von 20 bis 40 kDa. Sie sind wichtige Regulatoren der Signaltransduktion, da sie von Rezeptoren ausgehende Signale zu Effektoren weiterleiten und so verschiedenste Zellfunktionen beeinflussen. Sie regulieren Vorgänge wie die Organisation und den Umbau des Aktin-Zytoskeletts, die Zelladhäsion, die Migration, die Zellpolarität, die Zellteilung, die Endozytose, den Vesikeltransport und die Onkogenese. Vor mehr als 20 Jahren wurde RhoA, das erste überhaupt identifizierte Mitglied der Rho/Rac-Familie, bei der Suche nach ras-verwandten Genen isoliert (Madaule *and* Axel, 1985). Durch die Verwendung konventioneller Klonierungstechniken und die Charakterisierung des Genoms konnte später nachgewiesen werden, dass das Gen nicht allein existiert. Mittlerweile wurden allein im menschlichen Genom 23 verschiedene Stellen gefunden, die durch alternatives Spleißen mindestens 26 verschiedene Proteine generieren können. In Übereinstimmung mit ihrer Homologie auf Aminosäureebene wurden diese Proteine in sechs Unterfamilien eingeteilt: Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RhoBTB und RhoT/Miro. RhoBTB und RhoT werden auch als atypische Rho/Rac-GTPasen bezeichnet, weil sie sich in Struktur, Regulation und Funktion sehr von den anderen GTPase-Unterfamilien unterscheiden. Wie die Mehrheit der Proteine der Ras-Superfamilie verhalten sich die meisten Rho/Rac-GTPasen als "molekulare Schalter", die zwischen aktiven und inaktiven Stadien wechseln können. Beide Konformationen sind abhängig von der Bindung von GDP oder GTP an die GTPasen (Bustelo *et al.*, 2007).

Rho-Proteine, speziell RhoA, Rac1 und Cdc42, die die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts kontrollieren, aktivieren PLD1 durch die direkte Interaktion mit dem C-Terminus des Enzyms

(Exton, 2002; Powner *and* Wakelam, 2002). Die Stimulierung von PLD durch RhoA kann einerseits durch direkte Interaktion geschehen, andererseits können indirekte, Rho-abhängige Mechanismen beteiligt sein (Oude Weernink *et al.*, 2007). Untersuchungen belegen, dass die Inhibierung des PLD-Signals nach Rho-Inaktivierung durch die Addition von PIP2 aufgehoben werden kann, was suggeriert, dass Rho-Proteine die PLD über eine PIP5K-Regulation beeinflussen (Schmidt *et al.*, 1996a; Schmidt *et al.*, 1996b). Von PIP2 ist bekannt, dass es die Aktivität Aktin-bindender Proteine reguliert, welche die Aktin-Dynamik organisieren (Hilpela *et al.*, 2004; Yin *and* Janmey, 2003). PA und PIP2 könnten zusammen wirken, um den Rho-abhängigen Aktin-Zytoskelett-Umbau zu vermitteln (Oude Weernink *et al.*, 2007). Die amino-terminalen 325 Aminosäuren der PLD1 sind für deren Aktivierung erforderlich (Sung *et al.*, 1999a). Im Gegensatz dazu zeigten Studien, dass Rho an eine Stelle am Carboxylende zwischen den Aminosäuren 873 und 1024 bindet (Cai *and* Exton, 2001; Yamazaki *et al.*, 1999).

1.2.1.3.6 *Proteinkinase C*

Einige Autoren haben gezeigt, dass die PKC die PLD1 auf direktem Wege ATP-unabhängig aktivieren kann. Andere Autoren wiederum behaupten, dass ein phosphorylierungsabhängiger Mechanismus entscheidend ist (Cockcroft, 2001). Es wurden embryonale Rattenfibroblasten und COS-7-Zellen mit PMA oder kompetitiven Inhibitoren der ATP-Bindestelle der PKC behandelt, um zu untersuchen, ob die PMA-abhängige Phosphorylierung der PLD1 durch PKC vermittelt wird (Kim *et al.*, 1999c). Dabei wurde die PLD-Aktivität durch PMA stimuliert und PLD1 gleichzeitig phosphoryliert. Diese PMA-abhängige Stimulation und Phosphorylierung konnte durch Inhibierung der PKC blockiert werden. Daraus wurde geschlossen, dass die PMA-induzierte Phosphorylierung der PLD1 auf PKC zurückgeführt werden kann. Des Weiteren wurde untersucht, ob die PMA-induzierte PLD1-Phosphorylierung direkt durch PKC vermittelt wird. Dabei kam man zu dem Ergebnis, dass, solange die gereinigte PKC α die Fähigkeit zur Autophosphorylierung besaß, sie die PLD1 in Abwesenheit von PMA nicht phosphorylieren konnte. Andererseits wurde sie durch PMA noch stärker autophosphoryliert und phosphorylierte auch PLD1. PKC α phosphoryliert PLD1 am Serinrest 2, Threonin 147 (in der PX-Domäne) und Serin 561 (in der *loop*-Region). Mutationen an diesen Stellen führen zur signifikanten Abnahme der PMA-induzierten PLD1-Aktivität (Kim *et al.*, 1999c).

Im Vergleich zu PLD1 hat PLD2 eine um das 1.500-fache höhere Grundaktivität (Colley *et al.*, 1997), die durch ARF, G-Proteine der Rho-Familie und PKC nur um das 1,5 – 2-fache erhöht werden kann (Colley *et al.*, 1997; Lopez *et al.*, 1998; Sung *et al.*, 1999a). Für diese Untersuchung transfizierten Colley *et al.* (1997) Zellen von *Spodoptera frugiperda* (sf9) mit

PLD2 und stellten fest, dass die basale Aktivität dieser PLD-Isoform gegenüber PLD1 signifikant erhöht war. Die Zugabe der PLD1-Stimulatoren ergab aber keine weitere Steigerung der Aktivität. Die Stimulation von PLD1-transfizierten Zellen mit PMA dagegen ergab eine Steigerung der Aktivität um das 10 – 15-fache. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass PLD1 in unstimulierten Zellen nicht aktiv ist (Colley *et al.*, 1997). Die Co-Expression von PKC α und PLD2 führte zu einem Anstieg der PLD2-Aktivität. Dies bestätigte die Vermutung, dass PKC α die PLD2-Aktivität reguliert (Siddiqi *et al.*, 2000; Slaaby *et al.*, 2000).

1.2.1.4 Lokalisation der PLD-Isoformen in der Zelle

Die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von PLD1 und PLD2 hat zu verschiedenen Ergebnissen geführt (Jenkins *and* Frohman, 2005). Da die Lokalisation oft nicht eindeutig geklärt werden konnte und es sich als schwierig erwies, zwischen PLD1 und PLD2 zu unterscheiden, griffen viele Arbeitsgruppen zu markierten PLDs, um die Lokalisation mikroskopisch zu untersuchen (Cockcroft, 2001). Während generelle Übereinstimmung herrscht, dass sowohl PLD1 als auch PLD2 in Zellen ausschließlich membranlokalisiert sind, ist ihre Verteilung stark heterogen. Untersuchungen verschiedener Zelltypen ergaben, dass sie an Plasmamembran, ER, Golgi, Endosomen, sekretorischen Granula, Nukleus und Lysosomen lokalisiert sind (McDermott *et al.*, 2004). Für die subzelluläre Lokalisation beider PLD-Isoformen wurden an Hypophysen- und Nierenzellen Studien mit Antikörpern gegen PLD1 und PLD2 durchgeführt. Sie zeigten, dass 25 – 30 % beider Enzyme im Golgi-Apparat lokalisiert sind. Während PLD1 überall in dieser Organelle lokalisiert ist, findet man PLD2 an den Membranen der Golgi-Zisternen (Freyberg *et al.*, 2001; Freyberg *et al.*, 2002).

Für PLD1 ist in unterschiedlichen Zelllinien eine perinukleäre Verteilung (Golgi, ER, späte Endosomen) angegeben worden (Colley *et al.*, 1997; Freyberg *et al.*, 2001; Lucocq *et al.*, 2001; Sung *et al.*, 1999b). Andere Arbeitsgruppen fanden PLD1 nur an späten Endosomen und Lysosomen (Toda *et al.*, 1999). Bei Arbeiten von Du *et al.* (2003) dagegen war PLD1 an Recycling-Endosomen, frühen Endosomen und zum Teil im Golgi lokalisiert. Mehrere Studien über die Lokalisation von PLD1 deuten an, dass dieses Protein in endosomalen / lysosomalen Kompartimenten lokalisiert ist (Brown *et al.*, 1998; Toda *et al.*, 1999). Häufig wurden RBL-2H3-Mastzellen für diese Untersuchungen verwendet. In diesen Zellen wurde PLD1 im lysosomalen Kompartiment gefunden. Die Aufgabe des lysosomalen Kompartiments ist die Bildung sekretorischer Granula, die infolge eines Stimulus exozytiert werden. PLD1 scheint in RBL-Zellen an diesem Kompartiment lokalisiert zu sein (Brown *et al.*, 1998). Zudem wird berichtet, dass PLD1 nach einer Stimulation mit sekretorischen Granula kolokalisiert und an die Plasmamembran wandert (Brown *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2002; Du *et al.*, 2003; Emoto *et*

al., 2000; Huang *et al.*, 2005). In einer dieser Studien wurde PLD in COS-7-Zellen überexprimiert, die Zellen anschließend stimuliert und über mehrere Stunden beobachtet. Vor der Stimulation war PLD1 fast ausschließlich in perinukleären Vesikeln lokalisiert. Die Stimulation mit PMA verursachte innerhalb von 2 h eine Translokation des größten Teils der PLD1 zur Plasmamembran und zu peripheren Vesikeln. Etwa 4 h nach der Stimulation war zu beobachten, dass fast die gesamte PLD1 wieder zu den perinukleären Vesikeln zurückgekehrt ist, nur in manchen Zellen verblieb noch ein Teil des Enzyms in der Plasmamembran (Du *et al.*, 2003).

PLD2 ist hauptsächlich in der Plasmamembran lokalisiert (Colley *et al.*, 1997; Du *et al.*, 2004; Honda *et al.*, 1999), wurde allerdings auch schon im Zytosol (Honda *et al.*, 1999), in submembranösen vesikulären Kompartimenten (Divecha *et al.*, 2000) und in Kolo-kalisation mit β -Aktin (Lee *et al.*, 2001) nachgewiesen. Aus Tab. 1 ist ersichtlich, dass die PLD-Isoformen sowohl in der Plasmamembran als auch in intrazellulären Kompartimenten (ER, Golgi, Lysosomen, Endosomen) identifiziert wurden. Die Plasmamembran enthält womöglich Mikrodomänen, die lateral begrenzt in der Lipid-Doppelschicht liegen und deren einzigartige Lipid- und Proteinzusammensetzung spezifische Funktionen widerspiegeln – beispielsweise Regionen mit Signalaktivität oder Regionen, in denen Kompartimente fusionieren (Cockcroft, 2001). Charakteristisch für diese Mikrodomänen ist die Anreicherung mit Phosphoinositolen (Hope *and* Pike, 1996; Pike *and* Casey, 1996; Pike *and* Miller, 1998). PLD2 und in einigen Fällen auch PLD1 wurden mit diesen Mikrodomänen assoziiert gefunden (Cockcroft, 2001).

Tab. 1: Lokalisation der PLD-Aktivität und der PLD-Isozyme (Cockcroft, 2001). FMLP – N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin, HL60 – humane promyelotische Leukämiezellen, HeLa – humane Zervixkarzinomzellen, 3T3 Li – Albino-Maus-Fibroblasten, BHK – Hamster-Nierenzellen, NRK – Ratten-Nierenzellen, Vero – Nierenzellen der grünen Meerkatze, RBL – Ratten-Mastzellen, 3Y1 – Ratten-Fibroblasten, U937 – humane histiozytäre Lymphomzellen, CHO – Hamster-Ovarienzellen, PMA – Phorbol-12-Myristat-Acetat, ER – Endoplasmatisches Retikulum, PEt – Phosphatidylethanol, ARF – ADP-Ribosylierungsfaktor, EGFP – engl.: *enhanced green fluorescent protein*.

Zelltyp	Stimulus	Zellkompartiment	Aktivitätsmessungen	Referenz
Humane Neutrophile Granulozyten	FMLP	Plasmamembran	Bildung von PEt in Zellen	(Gelas <i>et al.</i> , 1989)
Humane Neutrophile Granulozyten	FMLP	mit der Plasmamembran fusionierende endozytische sekretorische Vesikel	ARF-abhängige PLD-Aktivität	(Morgan <i>et al.</i> , 1997)
HL60	FMLP	Plasmamembran und Endomembranen	Bildung von PEt in Zellen	(Whatmore <i>et al.</i> , 1996)
HL60		Plasmamembran und Endomembranen	ARF-stimulierte PLD-Aktivität	(Whatmore <i>et al.</i> , 1996)
HeLa	PMA	Plasmamembran, ER	Bildung von PEt in Zellen	(Edwards <i>and</i> Murray, 1995)
3T3 Li	Bradykinin	Plasmamembran, ER	Bildung von PEt in Zellen	(Edwards <i>and</i> Murray, 1995)
Rattenembryo-Fibroblasten (REF-52)		Plasmamembran	HA-markierte PLD2	(Colley <i>et al.</i> , 1997)
Rattenembryo-Fibroblasten (REF-52)		Golgi, ER, Endosomen	HA-markierte PLD1	(Colley <i>et al.</i> , 1997)
BHK-Zellen	PMA	ER	Bildung von PEt in Zellen	(Decker <i>et al.</i> , 1996)
NRK, Vero, HeLa		Späte Endosomen, Lysosomen	FLAG-markierte PLD1a und HA-markierte PLD1b	(Pike <i>and</i> Casey, 1996)
RBL		Plasmamembran	EGFP-markierte PLD2	(Brown <i>et al.</i> , 1998)
RBL		Sekretorische Granula, Lysosomale Marker	EGFP-markierte PLD1b (wandert nach Antigenstimulation zur Plasmamembran)	(Brown <i>et al.</i> , 1998)
3Y1-Fibroblasten		Plasmamembran, ER, Golgi	Endogene PLD1-Aktivität, GFP-PLD1	(Kim <i>et al.</i> , 1999a; Kim <i>et al.</i> , 1999d)
U397, HL60		Detergenz-unlösliches Zytoskelett	PLD1 mit ARF und Rho	(Hodgkin <i>et al.</i> , 1999; Iyer <i>and</i> Kusner, 1999)
U937, Humane Keratinozyten, CHO		Detergenz-unlösliche Fraktion	PLD2	(Czarny <i>et al.</i> , 1999; Czarny <i>et al.</i> , 2000)

1.2.1.5 Funktionen der PLD

Die Entdeckung der hochgradigen Sensitivität der Säuger-PLD (insbesondere PLD1) gegenüber der Stimulation durch Proteine der ARF-Familie oder GTP-bindende Proteine gab den Anlass, die PLD-Aktivität *in vitro* zu untersuchen. Da ARFs bekanntermaßen eine Rolle bei der Kontrolle des vesikulären Transports zwischen ER und Golgi spielen, führte dieser Sachverhalt zu der Überlegung, dass die Aktivierung der PLD eine bedeutsame, wenn auch nicht obligatorische Rolle bei diesem Prozess spielen könnte (McDermott *et al.*, 2004). Durch die Verwendung primärer Alkohole ist eine Rolle der PLD beim Transport von Vesikeln herausgestellt worden (Bi *et al.*, 1997; Ktistakis *et al.*, 1996). Es wurde gezeigt, dass die PLD die Abgabe entstehender sekretorischer Vesikel vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) stimuliert (Chen *et al.*, 1997) und zur Erhaltung der strukturellen Integrität und Funktion des Golgi-Apparates nötig ist. Die genaue Rolle der PLD bei der Vesikelbildung ist allerdings bisher umstritten (Oude Weernink *et al.*, 2007). Untersuchungen zeigten, dass die endogenen Phospholipide der Golgi-Membranen Substrate sowohl für die endogene als auch exogen zugefügte PLD sind und dass diese Lipid-Hydrolyse mit der Vesikelabschnürung vom TGN korreliert. Dabei stellte sich folgende Frage: Wenn die Spaltung von PC durch PLD (wodurch PA entsteht) für die Vesikelabschnürung notwendig ist, sollte die Hemmung der PA-Produktion dann auch die Freisetzung entstehender Vesikel unterbinden? Um dieser Frage nachzugehen, wurden permeabilisierte Zellen mit 1 % 1-Butanol, Isopropanol und tertiärem Butanol inkubiert und die Wirkung auf die Vesikelabschnürung untersucht. 1-Butanol hemmte die Vesikelfreisetzung bis zu ca. 50 %. Die Hemmung der Vesikelabschnürung durch 1 % 1-Butanol führte zur Bildung von PBut, dem Hauptprodukt der PLD-Aktivität. Im Gegensatz dazu hatten Isopropanol oder tertiäres Butanol, die nicht an der Transphosphatidylierung beteiligt sind, keinen Effekt auf die Vesikelabschnürung. Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass die enzymatisch aktive PLD 1 und PA, das Produkt der Spaltung von PC, für die Freisetzung entstehender Vesikel aus dem TGN nötig sind (Chen *et al.*, 1997).

Neutrophile und Mastzellen beinhalten sekretorische Granula, die man auch als modifizierte Lysosomen bezeichnen könnte (Cockcroft, 2001). Der erste Hinweis, dass die PLD-Aktivierung für exozytotische Vorgänge bei Neutrophilen und Mastzellen notwendig sein könnte, resultierte aus der Beobachtung, dass Alkohole die Exozytose blockieren. Weitere Analysen bestätigten die Bedeutung von ARF und PLD für die Exozytose bei primären Neutrophilen und Mastzellen sowie den ihnen verwandten Zelllinien HL60 und RBL (Brown *et al.*, 1998; Fensome *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1999; Way *et al.*, 2000). Wie die PLD-Aktivität genau in die Kontrolle der Vesikelabschnürung bei der Endozytose von Golgi und Plasmamembran sowie in die Exozytose – die Prozesse der Membranspaltung und Membranfusion – involviert ist, ist jedoch noch unklar. Eine einfache, aber interessante Möglichkeit ist, dass die Um-

wandlung des Zwitterions PC in PA sowohl den elektrostatischen Angriff auf Membranoberflächen verändert als auch, aufgrund der Unterschiede in der Kopfgruppengröße von Substrat und Produkt, Membrankrümmung und Instabilität der Doppelmembran verursachen kann (McDermott *et al.*, 2004). Zudem ist nachgewiesen worden, dass PLD und PIP5K gemeinsam Rho-induzierte Veränderungen am Aktin-Zytoskelett bewirken (Oude Weernink *et al.*, 2007). Folglich wird die durch Arginin-Vasopressin-induzierte myogene Differenzierung, welche die Aktinfaserbildung beinhaltet, durch Rho-Proteine und PLD1 vermittelt. Dies beinhaltet auch die PLD-induzierte PIP2-Synthese an den Aktinfasern (Komati *et al.*, 2005).

Des Weiteren wurde eine signifikante Erhöhung der PLD-Aktivität in menschlichen Krebszellen (bei Brust-, Nieren-, Magen- und Darmkrebs) festgestellt, was vermuten lässt, dass die PLD auch bei der Tumorgenese eine Rolle spielt (Noh *et al.*, 2000; Uchida *et al.*, 1997; Uchida *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2000). Untersuchungen belegen, dass sich die nukleäre RhoA- und ARF-aktivierte PLD in der Kernhülle befindet (Baldassare *et al.*, 1997; Banno *et al.*, 1997). Zudem ist PLD1 in Kernen von Hypophysenvorderlappenzellen bei Ratten immunolokalisiert worden (Freyberg *et al.*, 2001). Andere Studien fanden PLD2 in menschlichen Nierenkrebszellen (Zhao *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die intranukleäre Aktivierung von PLD eine wichtige Rolle bei der Proliferation bestimmter Krebszelllinien spielt (Kim *et al.*, 2007).

1.3 Fettsäuren

Fettsäuren sind Carbonsäuren mit unterschiedlich langen Kohlenwasserstoffketten (zwischen 4 und 36 C-Atomen). Diese Kohlenwasserstoffketten sind meist unverzweigt und geradzahlig, da sie aus C2-Körpern synthetisiert werden. Sie sind gesättigt oder sie enthalten eine oder mehrere Doppelbindungen und sind somit ungesättigt. Die Anzahl dieser Doppelbindungen und die Länge der Kohlenwasserstoffketten wirken sich auf die physikalischen Eigenschaften der Verbindungen aus, in denen sie enthalten sind. Je länger eine Fettsäurekette ist und je weniger Doppelbindungen sie enthält, desto schlechter ist ihre Löslichkeit in Wasser. Auch die Schmelzpunkte liegen bei gesättigten Fettsäuren bei höheren Temperaturen, wogegen ungesättigte Fettsäuren der gleichen Kettenlänge schon bei Raumtemperatur flüssige Öle sind. Physiologisch vorkommende ungesättigte Fettsäuren enthalten eine oder mehrere isolierte cis-Doppelbindungen und sind im Organismus meist Bausteine von Tri- und Phosphoglyceriden, Glyco- und Sphingolipiden und Cholesterinestern, mit denen sie hauptsächlich durch die Nahrung aufgenommen werden. Bei der Verdauung der Nahrungsfette im Darmlumen werden die Fettsäuren von den komplexen Lipiden abgespalten, von Mukosazellen aufgenommen und anschließend wieder zu komplexen Lipiden zusammengesetzt. Für

den Transport im Blut werden die Lipide von Lipoproteinen umschlossen. Es entstehen Chylomikronen, die über die Lymphe ins Blut und zu den Körperzellen gelangen. Die endotheliale Lipoproteinlipase kann die Fettsäuren von den komplexen Lipiden abspalten, wodurch diese dem jeweiligen Gewebe zur Verfügung stehen.

1.3.1 Ungesättigte und essentielle Fettsäuren

Anhand der Stellung ihrer Doppelbindungen werden die ungesättigten Fettsäuren in verschiedene Familien eingeteilt, die von höheren Eukaryoten nicht ineinander umgewandelt werden können. Man unterscheidet dabei zwischen der Δ -Nomenklatur und der ω - (oder n -) Nomenklatur. Die Δ -Nomenklatur zählt die Doppelbindungen vom Carboxylende aus und die ω/n -Nomenklatur gibt die Lage der ersten Doppelbindung vom Methylende gesehen an.

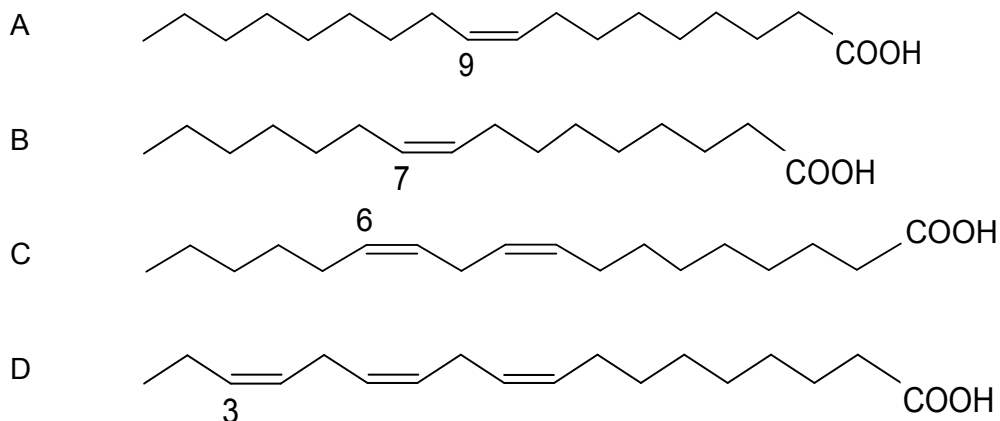


Abb. 7: Fettsäurenfamilien. A – Ölsäure, C18:1n9 (n9-Familie), B – Palmitoleinsäure, C16:1n7 (n7-Familie), C – Linolsäure, C18:2n6 (n6-Familie), D – α -Linolensäure, C18:3n3 (n3-Familie).

Die langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA, engl.: *polyunsaturated fatty acids*) mit 20 oder 22 C-Atomen sind essentielle Komponenten von Membranphospholipiden bei Säugern. Sie bestimmen die Fluidität und Permeabilität von Membranen und beeinflussen das Verhalten membrangebundener Enzyme und Rezeptoren (Das, 2006b). Docosahexaensäure (DHA, C22:6n3) und Arachidonsäure (AA, C20:5n6) beispielsweise sind in großer Menge in neuronalen Geweben (wie Gehirn und Retina) und Hoden nachgewiesen worden (Bourre *et al.*, 1992; Retterstol *et al.*, 2000). Ein Mangel an diesen Fettsäuren kann unter anderem zu Störungen der neuro-visuellen Entwicklung und anderen Komplikationen bei Frühgeborenen führen (Carlson *et al.*, 1993; Crawford *et al.*, 1997; Innis *et al.*, 1999; Lauritzen *et al.*, 2001). PUFAs können als Vorläufer von Wachstumsregulatoren und Hormonen (Leonard *et al.*, 2004) wie Eicosanoiden (Prostaglandinen, Thromboxanen und Leukotrienen) dienen (Pereira *et al.*, 2003). Daher haben sie große Auswirkungen auf physiolo-

gische Prozesse wie die Wahrnehmungsfunktion, immunologische, inflammatorische, sekretorische und reproduktionsbiologische Vorgänge (Simopoulos, 2002).

Tab. 2: Vorkommen ungesättigter Fettsäuren.

Bezeichnung	Name	Vorkommen
<i>Einfach ungesättigte Fettsäuren</i>		
C 16:1n9	Palmitoleinsäure	In Milch- und Depotfett, Bestandteil von Pflanzenölen
C 18:1n9	Ölsäure	Hauptbestandteil aller Fette und Öle
C 24:1n9	Nervonsäure	In Cerebrosiden
<i>Mehrfach ungesättigte Fettsäuren</i>		
C 18:3n3	α -Linolensäure	In Pflanzenölen, Walnüssen, grünem Blattgemüse
C 20:5n3	Eicosapentaensäure	In Fischölen und einzelligen Organismen wie Mikroalgen und Pilzen
C 22:6n3	Docosahexaensäure	In marinen Protisten, Fischöle
C 18:2n6	Linolsäure	In Pflanzenölen und Depotfett
C 18:3n6	γ -Linolensäure	In Pflanzenölen
C 20:4n6	Arachidonsäure	In Fleisch, Eidotter, Bestandteil vieler Phosphoglyceride

Die Biosynthese der ungesättigten Fettsäuren erfolgt bei Säugern hauptsächlich in der Leber. Diese enthält einen membrangebundenen Enzymkomplex, bestehend aus NADPH-Cytochrom-b₅-Reduktase, Cytochrom b₅ und einer Desaturase, welcher in der Lage ist, Doppelbindungen in gesättigte Fettsäuren einzuführen. Desaturasen tierischer Zellen sind nur in der Lage, Doppelbindungen zwischen dem Carboxylende und dem 9. C-Atom der Fettsäure einzuführen. Da Säugern Enzymsysteme fehlen, welche Doppelbindungen am 3. oder 6. C-Atom einbauen, können sie diese Fettsäuren nicht selbst bilden. Der Organismus benötigt diese Fettsäuren aber für die Synthese anderer ungesättigter Fettsäuren, weshalb sie mit der Nahrung aufgenommen werden müssen und als essentielle Fettsäuren bezeichnet werden. Linol- (LA, C18:2n6) und α -Linolensäure (ALA, C18:3n3) sind für Säuger essentiell. Sie können durch eine Reihe von Desaturierungen und Elongationen in längere Fettsäuren mit weiteren Doppelbindungen umgewandelt werden (Sprecher, 1981). LA ist dabei die Vorstufe der n6-Fettsäuren-Familie und ALA die Vorstufe der n3-Familie. Ein Großteil der über die Nahrung aufgenommenen LA oder ALA durchläuft allerdings die β -Oxidation für die Energiegewinnung. Nur ein geringer Teil (3 % und 1,5 %) wird in die längeren PUFAs umgewandelt, um den Stoffwechselbedarf zu decken (Cunnane *and* Anderson, 1997). Schon 1929 wurden Untersuchungen zu Mangelercheinungen mittels einer LA- und ALA-freien Diät an Ratten durchgeführt (Burr *and* Burr, 1929). Dabei wurden unter anderem trockene und schuppige Haut, Fettleber, Unfruchtbarkeit und der Verlust der Zellintegrität beobachtet. Wurden diese Fettsäuren dem Futter allerdings wieder zugesetzt, normalisierten sich die Veränderungen

im Verlauf von etwa acht Wochen (Watson, 1998).

1.3.1.1 Stoffwechsel der n3- und n6-PUFA

Bei Säugern werden die langkettigen PUFA durch Kettenverlängerung (Elongation) und Einführung alternierender Doppelbindungen (Desaturierung) synthetisiert. Membrangebundene Desaturasen und Elongasen katalysieren diese Vorgänge (Leonard *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2003). Desaturasen sind spezifisch für die Position und die Anzahl der in den Fettsäuren vorhandenen Doppelbindungen. So kann bspw. eine $\Delta 9$ -Desaturase eine Doppelbindung nur zwischen dem 9. und dem 10. C-Atom einer Fettsäure einführen (Pereira *et al.*, 2003).

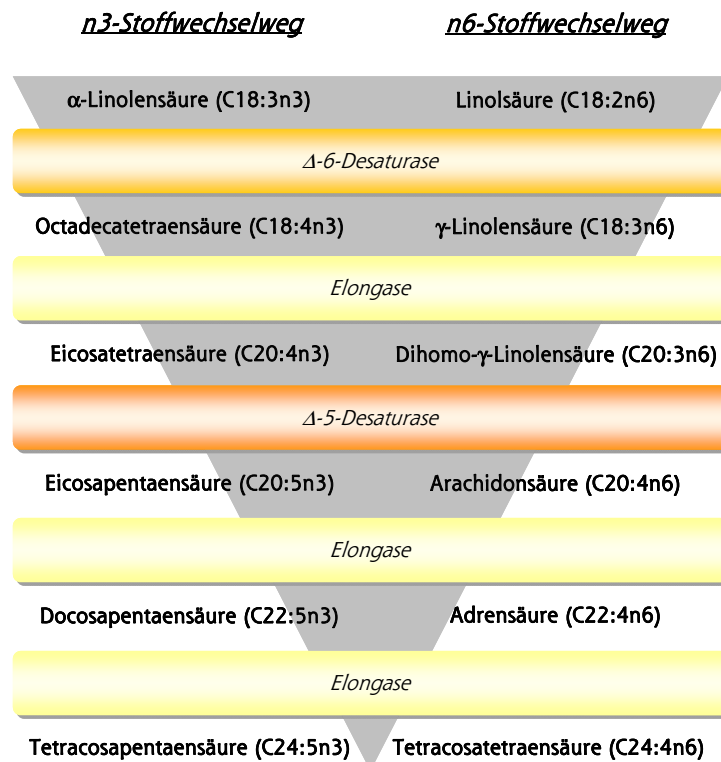


Abb. 8: Stoffwechselwege der n6- und n3-Fettsäurenfamilien. Diese vereinfachte Darstellung zeigt die Umwandlung von Linolsäure und α-Linolensäure in ihre längerkettigen und mehrfach ungesättigten Metabolite durch Desaturierung und Elongation.

LA wird durch die $\Delta 6$ -Desaturase in γ-Linolensäure (GLA, C18:3n6) umgewandelt. Die $\Delta 6$ -Desaturase ist ein sogenanntes *front-end*-Enzym, da sie Doppelbindungen zwischen einer schon vorhandenen Doppelbindung und dem Carboxylende der Fettsäurenkette einbauen kann (Pereira *et al.*, 2003). Durch das Anfügen zweier C-Atome durch die Elongase entsteht aus GLA Dihomo-γ-Linolensäure (DGLA, C20:3n6), der Vorläufer der Prostaglandine der 1er Serie. Die $\Delta 5$ -Desaturase (ebenfalls ein *front-end*-Enzym) katalysiert nun den letzten Schritt

bei der Entstehung der C20-PUFA und fügt eine weitere Doppelbindung ein. So entsteht Arachidonsäure (AA, C20:4n6), der Vorläufer der entzündungsfördernden Prostaglandine der 2er und Leukotriene der 4er Serie. Auf dieselbe Art und Weise werden auch die Fettsäuren der n3-Familie metabolisiert und ALA (C18:3n3) so in Eicosapentaensäure (EPA, C20:5n3) umgewandelt. EPA bildet die Vorstufe für die Synthese der entzündungshemmenden Prostaglandine der 3er Serie und Leukotriene der 5er Serie.

Die für diese Metabolisierung notwendigen Enzymsysteme befinden sich an der zytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und werden von verschiedenen Faktoren reguliert. Die Fettsäuren konkurrieren um diese Enzymsysteme, da sowohl die n3- als auch die n6- und die n9-Familie dieselben Enzyme für ihren Stoffwechsel benötigen. Die n3-Fettsäuren werden im Gegensatz zu den n6- und n9-Fettsäuren von den $\Delta 6$ - und $\Delta 5$ -Desaturasen bevorzugt (Das, 2006a). Daher können geringe Konzentrationen von ALA (C18:3n3) die Umsetzung von LA (C18:2n6) unterdrücken (Mohrhauer *and* Holman, 1963). Allerdings wird überwiegend LA (C18:2n6) umgewandelt, da diese Fettsäure durch die Nahrung meist in größerer Menge aufgenommen wird (Burdge, 2004). Die $\Delta 6$ -Desaturase katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dieser Reaktion (Pereira *et al.*, 2003). Ihre Aktivität ist abhängig von Pyridoxin, Zink und Magnesium. Sie nimmt mit zunehmendem Alter ab. Während Insulin und fettfreie Nahrung die Aktivität des Enzyms steigern, wird es unter anderem durch Fasten, Proteinmangel, glucosereiche Nahrung, Diabetes mellitus und Hyperlipidämie gehemmt (Das, 2006a).

1.3.1.2 Bedeutung ungesättigter Fettsäuren für zelluläre Membranen

Die Fluidität von Zellmembranen ist in starkem Maße von ihrer Lipid-Zusammensetzung abhängig. Die vermehrte Einlagerung von gesättigten Fettsäuren und Cholesterol in die Membranphospholipide macht sie relativ starr und unbeweglich, wogegen der Einbau ungesättigter Fettsäuren die Fluidität erhöht. Dabei erhöht sich auch die Anzahl der Rezeptoren und deren Affinität zu den zugehörigen Hormonen oder Wachstumsfaktoren (Das, 2006a). Diätetisch aufgenommene Fettsäuren werden in die Zellmembran integriert, weshalb die Lipid-Zusammensetzung der Membran die Zusammensetzung der aufgenommenen Fettsäuren reflektiert (Clamp *et al.*, 1997). So werden auch die Zellen des Immunsystems (Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen oder polymorphkernige Zellen) durch diätetische Lipide beeinflusst (Chapkin *and* Carmichael, 1990; Tiwari *et al.*, 1987). Werden mit der Nahrung vermehrt n3-Fettsäuren zugeführt, ersetzen diese teilweise die n6-Fettsäuren in den Membranen der Zellen (Simopoulos, 2002). Für die Veränderung der Phospholipid-Zusammensetzung der Plasmamembran sind aber mehrere Faktoren von Bedeutung. So ist

neben der Menge auch die Art und Dauer der Lipidaufnahme wichtig (De Pablo *and* De Cienfuegos, 2000).

Die Fettsäuren-Zusammensetzung der Zellmembran wirkt sich zudem auf die für die Signaltransduktion wichtigen Bereiche, die sogenannten *Lipid Rafts* aus. Dabei handelt es sich um Mikrodomänen in der Zellmembran, die durch eine hohe Konzentration von Cholesterol und Sphingolipiden gekennzeichnet sind und deren polare Lipide hauptsächlich aus gesättigten Fettsäureacylresten bestehen (Brown *and* Rose, 1992; Schroeder *et al.*, 1994). Sie integrieren sich daher nicht so gut in die fluide Phospholipid-Doppelschicht, weshalb sich Mikrodomänen ausbilden (Fan *et al.*, 2003). Biochemisch werden diese Mikrodomänen durch Unlöslichkeit gegenüber nicht-ionischen Detergentien gekennzeichnet, was ihre Isolierung erleichtert (Brown *and* Rose, 1992; Schroeder *et al.*, 1994). Zytoplasmatische und Transmembranproteine können über ihre acylierten Seitenketten mit *Lipid Rafts* assoziieren. Dies geschieht entweder über einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker oder über Acylierung der Proteine, wie z. B. bei den Tyrosinkinasen der Src-Familie (Ehehalt *et al.*, 2006). Untersuchungen an RBL-Zellen zeigten, dass auch die IgE-vermittelte Mastzellaktivierung von der Einlagerung des Fcε-Rezeptors I in *Lipid Rafts* abhängig ist (Field *et al.*, 1997). Ändert sich die Fettsäurezusammensetzung der Zellmembran, hat dies auch Auswirkungen auf die *Lipid Rafts*. An T-Zellen konnte gezeigt werden, dass PUFA acylierte Proteine aus *Lipid Rafts* verdrängen (Stulnig *et al.*, 1998). Wahrscheinlich verdrängen die PUFA Sphingolipide aus den Mikrodomänen und erschweren damit die Assoziation der Proteine (Fan *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2004).

1.3.1.3 Bedeutung ungesättigter Fettsäuren für das Immunsystem

Viele Faktoren tragen zum komplexen Ablauf von Entzündungsreaktionen bei. PUFAs spielen bei diesen Prozessen eine signifikante Rolle. Sie beeinflussen sowohl die Gesundheit im Allgemeinen als auch Krankheitsverläufe (Stulnig, 2003). Zu solchen Erkrankungen gehören kollagen-vaskuläre Erkrankungen, Hypertension, Diabetes mellitus, Metabolisches Syndrom (Syndrom X), Psoriasis (Schuppenflechte), Ekzem, Atopische Dermatitis, Herzkranzgefäßerkrankungen, Artherosklerose und Krebs (Das, 2006a). In der frühen Phase der Immunreaktion werden große Mengen von Interleukinen und Lipidmediatoren freigesetzt. Proinflammatorische Eicosanoide entstehen aus AA, die während der beginnenden Entzündungsreaktion aus Membranphospholipiden abgespalten wird. Im Gegensatz dazu kann auch EPA freigesetzt werden und in Konkurrenz zu AA die weniger inflammatorischen und chemotaktischen Derivate synthetisieren (Simopoulos, 2002). Die Eicosanoide aus dem n3- und n6-Stoffwechsel haben somit teilweise entgegengesetzte Eigenschaften. Sie stellen die Verbin-

ding zwischen PUFAs, Entzündung und Immunität dar.

Eine wechselnde Fettsäurezusammensetzung kann die Immunzellfunktionen auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Einerseits ist die Fluidität der Plasmamembran (oder von Regionen der Plasmamembran) wichtig für das Funktionieren der Immunzellen. Untersuchungen an Zellkulturen haben gezeigt, dass Änderungen der Fettsäurezusammensetzung der Immunzellen die Fluidität ihrer Membranen modifizieren. Des Weiteren werden viele Zellsignalmoleküle aus Membranphospholipiden gebildet. Die daraus entstehenden Mediatoren regulieren wiederum die Aktivität von Proteinen, die an zellulären Signalkaskaden der Immunzellen beteiligt sind. Eine Änderung der Phospholipidzusammensetzung könnte die Affinität der Mediatoren zu den Enzymen, die Signalmoleküle herstellen, verändern und so die Immunantwort beeinflussen.

Eicosanoide sind Lipidmediatoren, die ein Grundgerüst von 20 C-Atomen aufweisen (griech.: *eicosi*, zwanzig). Substrate für ihre Bildung sind PUFA mit 20 C-Atomen. Diese sind häufig in der sn2-Position in Phospholipiden zellulärer Membranen verestert. Die Bildung der Eicosanoide kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Für gewöhnlich wird die reichlich vorhandene AA durch die Phospholipase A2 (PLA2) aus Membranphospholipiden freigesetzt. Durch die Prostaglandin-H-Synthase wird der Weg für die Synthese von Prostaglandinen (PG) und Thromboxanen (TX) der 2er Serie geebnet (Abb. 9; Calder et al., 2002). Die Prostaglandin-H-Synthase besitzt Hydroperoxydase- und Cyclooxygenaseaktivität und wird meist als Cyclooxygenase (COX) bezeichnet (Funk, 2001).

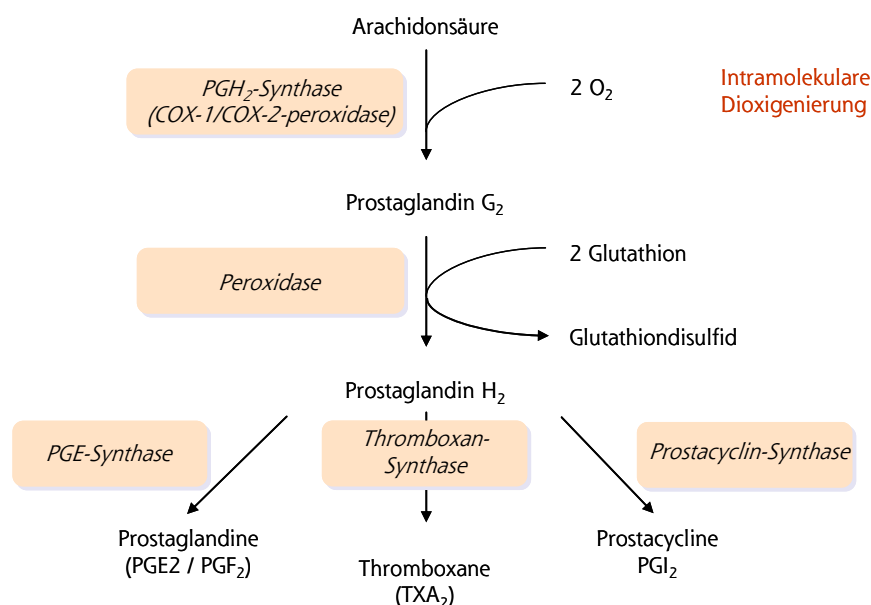


Abb. 9: Die Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandine, Thromboxane und Prostacycline der 2er Serie durch die Cyclooxygenase. COX – Cyclooxygenase, PGH/E/F – Prostaglandin H/E/F, TXA – Thromboxan A, PGI – Prostacyclin.

Prostaglandin E₂ (PGE₂) hat mehrere antiinflammatorische Effekte. Es inhibiert die Proliferation von Lymphozyten und die Produktion der Th1-Zytokine (Calder, 1997). Des Weiteren unterdrückt es die Produktion von TNF- α , IL-1 und IL-6 durch Monozyten und Makrophagen (Stulnig, 2003). Hinzu kommen diverse proinflammatorische Effekte wie die Induktion von Fieber und die Erhöhung der vaskulären Permeabilität sowie Vasodilatation.

Die andere Möglichkeit ist, dass AA durch die 5-Lipoxygenase (LOX) in 5-Hydroperoxyeicosatetraensäure (5-HPETE) und 5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE) und die Leukotriene (LT) der 4er Serie umgewandelt wird. Diese Umwandlung findet hauptsächlich in Monozyten/Makrophagen, Granulozyten und anderen inflammatorischen Zellen statt (Stulnig, 2003).

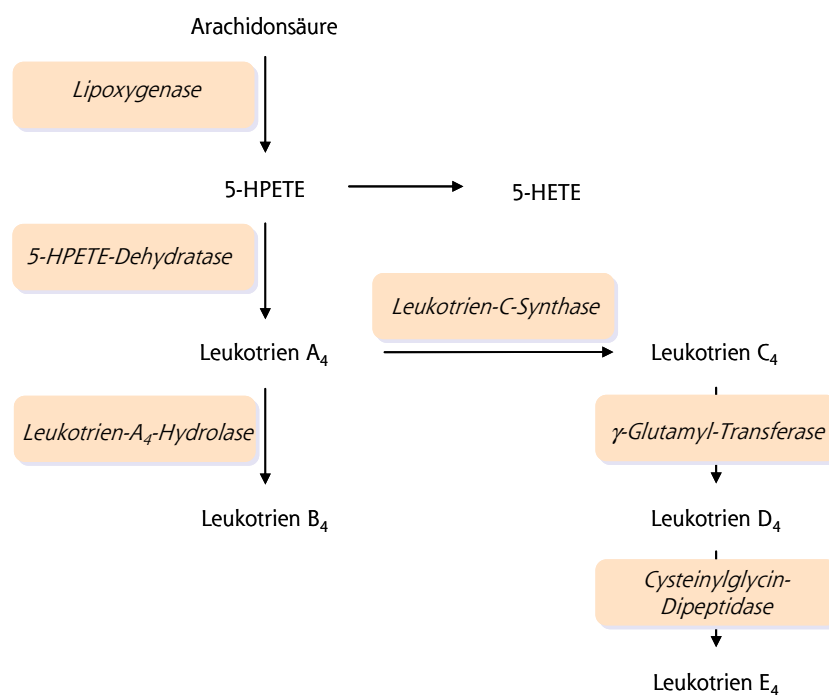


Abb. 10: Die Umwandlung von Arachidonsäure in Leukotriene. HPETE – Hydroperoxyeicosatetraensäure, HETE – Hydroxyeicosatetraensäure.

Die Wirkung der Leukotriene erfolgt meist über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Leukotrien B₄ (LTB₄) beispielsweise hat eine proinflammatorische Wirkung und wirkt fördernd auf Entzündungen durch Erhöhung der vaskulären Permeabilität. Es wirkt chemotaktisch auf Leukozyten, begünstigt dabei die Freisetzung lysosomaler Enzyme und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies ebenso wie die Bildung von TNF- α , IL-1 und IL-6 (Kinsella *et al.*, 1990).

Bei der Prostaglandinbildung konkurrieren die n3- und n6-Fettsäurenfamilien um die jeweiligen Enzymsysteme. So konkurriert die n3-Fettsäure EPA mit der n6-Fettsäure AA auf Cyclo- und Lipoxygenase-Ebene um die Bildung der Prostaglandine und Leukotriene (Simopoulos, 2002). Die Bildung der stark proinflammatorischen Prostaglandine der 2er Serie und Leu-

kotriene der 4er Serie wird so reduziert und die Bildung der weniger inflammatorischen Prostaglandine der 3er Serie und Leukotriene der 5er Serie gefördert. Bezogen auf den Gesamtorganismus ist dies durch veränderte Nahrungszusammensetzung schwerer zu zeigen, da Änderungen der Fettsäurezusammensetzung der Nahrung weniger starke Auswirkungen haben als in der Zellkultur (Calder *and* Grimble, 2002).

1.3.1.4 Bedeutung ungesättigter Fettsäuren für die Genexpression

Viele Effekte der n3- und n6-Fettsäuren beruhen auf einer veränderten Genexpression (Schmitz *and* Ecker, 2008), denn Gene können durch Fettsäuren an- oder ausgeschaltet werden (Duplus *and* Forest, 2002). Besonders die n3-Fettsäuren wirken sehr schnell auf die Genexpression; Veränderungen der für verschiedene lipogene Enzyme kodierenden mRNAs können schon innerhalb weniger Stunden nach Fütterung einer mit n3-Fettsäuren angereicherten Diät detektiert werden (Jump *et al.*, 1993; Jump *et al.*, 1994). Kernrezeptoren spielen in dieser Hinsicht eine entscheidende Rolle. Sie gehören zu einer Familie Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktoren, die auf direktem oder indirektem Wege verschiedene Gene des Lipidstoffwechsels kontrollieren können (Schmitz *and* Ecker, 2008). Die Fettsäure wirkt in diesem Fall wie ein Hormon, um die Aktivität oder die Menge der entscheidenden Transkriptionsfaktoren zu kontrollieren (Jump, 2002b). Zu den genannten Rezeptoren zählen z. B. die Peroxisom-Proliferator aktivierten Rezeptoren (engl.: *peroxisome proliferator activated receptors* [PPAR]), die den Steroidhormon-Rezeptoren angehören und in die vier Hauptklassen α -, β -, γ - und δ eingeteilt werden. Studien an PPAR α -*knockout*-Mäusen zeigten, dass PPAR α für viele Wirkungen der Fettsäuren auf die Genexpression verantwortlich ist (Dallongeville *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 1997). PPAR α spielt eine Rolle bei der Regulation eines komplexen Netzwerks von Genen des Glucose- und Lipidstoffwechsels einschließlich Fettsäuren-Transport, Fettsäurenbindungsprotein, Acyl-CoA-Synthese, mikrosomaler, peroxisomaler und mitochondrialer Oxidation, Ketogenese und Desaturierung (Desvergne *and* Wahli, 1999). Der Rezeptor bindet EPA und Ölsäure, wird aber wahrscheinlich nur von EPA aktiviert (Jump, 2002a). Auch PPAR γ bindet EPA und erhöht dadurch die Expression von Lipoproteinlipase sowie Fettsäuretransportern und hemmt gleichzeitig Zytokine, die Aktivität von NF κ B und die COX-2 Expression (Jump, 2002a).

Auch *Lipid rafts* und membranständige Rezeptoren unterliegen durch die Zufuhr mehrfach ungesättigter Fettsäuren strukturellen Modifikationen. Diese Modifikationen betreffen sowohl die Phospholipid-Komponente als auch die mit den *rafts* assoziierten Proteine (Jump, 2002b) und können so zelluläre Signaltransduktionswege und Enzymaktivitäten beeinflussen. In diesem Zusammenhang wurde vor einiger Zeit nachgewiesen, dass die Aktivität der cPLA₂

durch die Einwirkung der n3-Fettsäure EPA herabgesetzt wird (Calder *et al.*, 2002). Eine Erklärung hierfür bieten neueste, noch nicht veröffentlichte Ergebnisse von Fuhrmann *et al.*, wonach die Expression von PPARs durch n3-Fettsäuren gehemmt wird. An Präadipozyten konnte gezeigt werden, dass gerade die PPARs die cPLA₂-Transkription und –Translation fördern (Jiang *et al.*, 2001). Demnach können Fettsäuren, vermittelt durch Transkriptionsfaktoren, eine direkte Wirkung auf die Genexpression entfalten.

1.3.1.5 Ungesättigte Fettsäuren und PLD

Die PLD könnte ein bedeutendes Target für Fettsäuren sein (Benzaria *et al.*, 2007). Während gesättigte Fettsäuren die Aktivität der PLD nicht beeinflussen, wirken Ölsäure, AA und LA stimulierend auf PLD2 (Kim *et al.*, 1999b). Auf PLD1 dagegen hat Ölsäure eine hemmende Wirkung (Hammond *et al.*, 1995). Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass DHA (Bechoua *et al.*, 1998; Diaz *et al.*, 2002) oder 12-HETE, das monohydroxylierte Derivat von AA (Meskini *et al.*, 1995), die PLD-Aktivität ConA (Concanavalin A)-stimulierter menschlicher Lymphozyten erhöht. Weitere Arbeiten beschrieben PLD-abhängige Fettsäuren-Effekte bei Neutrophilen (Grenier *et al.*, 2003), glatten Muskelzellen (Askari *et al.*, 2002) oder Makrophagen (Wang *and* Oram, 2005). Bei Untersuchungen der PLD-Aktivität von intestinalen Mukosazellen stimulierten ALA und GLA die Aktivität des Enzyms am meisten, wobei ALA effektiver war als GLA. Man vermutet daher, dass die Anzahl der Doppelbindungen im Fettsäuremolekül eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des Enzyms in der Mukosa spielt (Awad *et al.*, 1994).

1.3.1.6 Ungesättigte Fettsäuren und Canine Atopische Dermatitis (CAD)

Die Canine Atopische Dermatitis ist eine genetisch veranlagte, chronisch verlaufende und wiederkehrende Erkrankung der Haut von Hunden. Die Tiere reagieren auf verschiedene Umwelteinflüsse wie Hausstaub-Milben, Schimmelpilze oder Pollen. Der Organismus bildet dabei Antikörper vom IgE-Typ gegen diese sonst „normalen“ Stoffe. Die Antikörper zirkulieren im Blut und haben eine hohe Affinität für bestimmte Zellen im Gewebe, besonders für antigenpräsentierende dendritische Zellen und Mastzellen. Diese Zellen exprimieren den Fcε-Rezeptor I auf ihrer Oberfläche, der gegenüber IgE eine hohe Affinität besitzt. Kommt es zum erneuten Kontakt mit dem Allergen, vernetzen sich die Antikörper auf der Zelloberfläche und bewirken so die Freisetzung von Entzündungsmediatoren (z. B. Histamin). Die Entzündungsmediatoren rufen die für diese Erkrankung typischen Erscheinungen hervor. Die Haut entzündet sich und es kommt zu Juckreiz und Gewebeschädigungen. Die veränderte Haut bietet nun ideale Lebensbedingungen für Bakterien und Hefepilze, die die Haut ebenfalls

schädigen und die Entzündung verstärken. Die entzündlichen Veränderungen werden durch Kratzen, Beißen und Lecken des Patienten weiter verstärkt. Die Haut kann ihrer Aufgabe, eine Barriere gegen eindringende Allergene und Krankheitserreger zu bilden, nicht mehr gerecht werden. Je mehr Allergene eindringen, desto mehr neue Stoffe in der Umgebung haben die Möglichkeit, den Patienten zu sensibilisieren und weitere allergische Reaktionen auszulösen.

Neben der spezifischen Immuntherapie (Hypo- oder Desensibilisierung) wird seit vielen Jahren nach Therapeutika gesucht, die möglichst wenige Nebenwirkungen für die Tiere haben. Etwa seit Mitte der 1980er Jahre werden in diesem Zusammenhang mehrfach ungesättigte Fettsäuren zur Behandlung der CAD eingesetzt. Man vermutet, dass die PUFA die Entzündungsreaktionen des Immunsystems modulieren und so ihre Wirkung entfalten. In zahlreichen Studien wird der positive Einfluss der PUFA auf Entzündungen und Juckreiz beschrieben. Allerdings weichen die Ergebnisse dieser Studien sehr stark voneinander ab, was am unterschiedlichen Design der Studien liegen könnte (Olivry *et al.*, 2001). In einer Untersuchung an atopischen Hunden, die eine Fettsäurensupplementierung bekommen hatten, wurde beispielsweise gar keine Verbesserung der Dermatitis festgestellt (Scott *and* Miller, Jr., 1990). Neuere randomisierte, kontrollierte Blindstudien wiederum beschreiben positive Effekte bei 17 % (Scarff *and* Lloyd, 1992) bzw. 57 % der behandelten Tiere (Harvey, 1999).

Die Mastzellen der Haut werden als die Schlüsseffektorzellen in der Atopischen Dermatitis betrachtet (DeMora *et al.*, 1996). Man vermutet, dass die Produktion und Freisetzung der Mastzell-Mediatoren von der Zusammensetzung ihrer Zellmembran abhängt (Gueck *et al.*, 2003). So konnte gezeigt werden, dass diätetische Fettsäuren die Zusammensetzung und Eigenschaften zellulärer Membranen verändern können (Grammatikos *et al.*, 1994a; Tocher *and* Dick, 2001). Wenn Mastzellen stimuliert werden, kommt es innerhalb von Minuten zur Synthese von Prostaglandinen. Die Art dieser gebildeten Prostaglandine und Leukotriene ist abhängig von der Zusammensetzung der Membranphospholipide (Gueck *et al.*, 2003). Da diätetisch verabreichte Fettsäuren direkt oder nach ihrer Metabolisierung in die Zellmembran eingebaut werden, beeinflussen sie so die Freisetzung der Mediatoren.

1.4 *Mastoparan*

Mastoparan gehört zu einer Gruppe nahe verwandter toxischer Peptide, die aus Wespengift isoliert wurden. Es wurde zuerst im Gift der Wespenart *Vespula lewisii* gefunden. Anschließend wurde eine Reihe von Mastoparan-Homologen auch bei anderen Wespenarten ent-

deckt (Argiolas *and* Pisano, 1984; Argiolas *and* Pisano, 1985; Hirai *et al.*, 1979b; Hirai *et al.*, 1979a; Holler *et al.*, 1999; Sukumar *and* Higashijima, 1992). Es handelt sich um eine Familie kleiner Peptide, bestehend aus 14 Aminosäuren mit einem C-terminal amidierten Leucin (Lai *et al.*, 2002b; Lai *et al.*, 2002a). Die biologische Aktivität des Mastoparans ist sehr vielfältig und beinhaltet zusätzlich zur Zell-Lyse (Song *et al.*, 1993; Todokoro *et al.*, 2006) u. a. die Aktivierung der Phospholipase A2 (PLA2), der Phospholipase C (PLC), der G-Proteine und der Guanylat-Cyclase. Es verursacht zudem die Hydrolyse von Phosphoinositiden durch Interaktion mit *Lipid Rafts* (Sugama *et al.*, 2005) und ist als starker Sekretionsstimulator bei diversen Säugerzellen bekannt (Hirai *et al.*, 1979b; Kurihara *et al.*, 1986), einschließlich der Histaminsekretion bei Mastzellen (Sukumar *and* Higashijima, 1992). Mastoparan ist ein Agonist der G-Proteine. Es konkurriert mit G-Protein-Rezeptoren (GPRs), um an G-Proteine binden zu können (Higashijima *et al.*, 1988; Higashijima *et al.*, 1990; Holler *et al.*, 1999).

Die meisten Effekte von Mastoparan können durch eine Vorbehandlung der Zellen mit Pertussis-Toxin blockiert werden. Pertussis-Toxin ADP-ribosyliert den G_i -Subtyp der G-Proteine und macht sie damit unempfindlich gegenüber hormoneller Regulation (Gilman, 1987). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde angenommen, dass G-Proteine an der Wirkung von Mastoparan beteiligt sind und dass Mastoparan bei Signaltransduktionswegen auf G-Proteine wirkt (Sukumar *and* Higashijima, 1992). Des Weiteren wurde die direkte Interaktion zwischen Mastoparan und G-Proteinen *in vitro* nachgewiesen, wobei gezeigt werden konnte, dass Mastoparan den GDP-GTP-Austausch der gereinigten G-Proteine G_i und G_o stimuliert (Gilman, 1987). Andere Untersuchungen deckten enge mechanistische Parallelen bei der Aktivierung von G-Proteinen durch Mastoparan und Liganden-gebundene Rezeptoren auf (Gilman, 1987; Higashijima *et al.*, 1988). Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass Mastoparan die Rezeptoren umgeht und direkt auf die G-Proteine wirkt. Mastoparan scheint somit einen hormonegebundenen Rezeptor zu imitieren und kann als exzellentes Modell dienen, Rezeptor-G-Protein-Interaktionen auf molekularer Ebene zu verstehen (Sukumar *and* Higashijima, 1992).

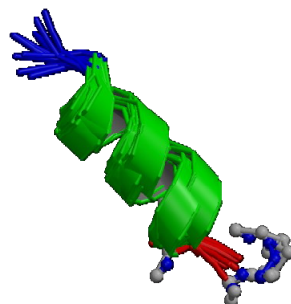


Abb. 11: Tertiärstruktur des Tetradecapeptids Mastoparan. Primärstruktur Ile-Asn-Leu-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Leu-Ala-Lys-Lys-Leu-Leu-NH₂ (Hori *et al.*, 2001).

Mastoparan kann in einer hydrophoben Umgebung eine amphipatische α -helikale Konformation einnehmen und Interaktionen physiologischer Proteine mit Zielproteinen imitieren (Malencik *and* Anderson, 1984; Murase *and* Iio, 2002; Sukumar *and* Higashijima, 1992). Auch wurde geschildert, dass Mastoparan die PLD1 in Zytosol-armen Zellen inhibiert (Fensome *et al.*, 1994). Neuere Studien deuten darauf hin, dass Mastoparan die PLD auch in intakten Zellen stimuliert (Farquhar *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1998; Mizuno *et al.*, 1998). Bei Untersuchungen über den Mechanismus der Wirkung von Mastoparan wurde festgestellt, dass einzig Mastoparan die PLD in kultivierten RBL-2H3-Zellen stark stimuliert (Chahdi *et al.*, 2003). Die Autoren haben in diesen Zellen die PLD-Aktivität gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass Mastoparan im Vergleich zu anderen über G-Proteine wirkenden Degranulationsstimulatoren die PLD-Aktivität besonders stark stimuliert. Des Weiteren wurden sowohl COS-7- als auch RBL-2H3-Zellen mit beiden Isoformen der PLD transfiziert, wobei festgestellt werden konnte, dass hauptsächlich PLD2 durch Mastoparan stimuliert wird, während PLD1 dagegen kaum beeinflusst zu werden scheint.

1.5 *Ziele der Arbeit*

Die langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren spielen eine große Rolle für die Entwicklung und die Gesundheit höherer Organismen. Von besonderer Bedeutung für Säuger sind hierbei die essentiellen Fettsäuren Linol- und α -Linolensäure, die vom Körper nicht synthetisiert werden können und daher mit der Nahrung zugeführt werden müssen. Diese über die Nahrung aufgenommenen Fettsäuren werden in die Phospholipide der Zellmembranen eingebaut und haben auf diese Weise Einfluss auf Membranfluidität, membranständige Rezeptoren und verschiedenste Signaltransduktionswege. Es ist zu vermuten, dass sie auch Enzyme, wie die Phospholipase D (PLD), beeinflussen, die am Entzündungsgeschehen der Caninen Atopischen Dermatitis (CAD) beteiligt sind. Die PLD ist ein rezeptorreguliertes Signalenzym, das für vielfältige biologische Funktionen (Exozytose, Phagozytose, Aktindynamik und der Aufbau zellulärer Membranen) eine wesentliche Rolle spielt. Da bei der CAD die Mastzellen der Haut eine Schlüsselrolle spielen, sollte die PLD in diesem Zusammenhang an der caninen Mastozytomzelllinie C2 untersucht werden.

Für die intrazelluläre Lokalisation der PLD waren mikroskopische Untersuchungen nötig. Da es sich bei der caninen Mastozytomzelllinie C2 um Suspensionszellen handelt, was die Transfektion und eine Dokumentation der Ergebnisse sehr erschwert, wurde ein weiteres Zellkulturmodell (COS-1) gewählt. Die COS-1-Zelllinie ist aus Nierengewebe der grünen Meerkatze (*Ceropithecus aetiops*) entwickelt worden. Es handelt sich hierbei um adhärent wachsende Zellen, die effizient transfizierbar sind und eine sehr gute mikroskopische Doku-

mentation ermöglichen.

Die vorliegende Arbeit hatte folgende Ziele:

- I Wie wirkt sich die Supplementierung des Zellkulturmediums von COS-1- und C2-Zellen mit den essentiellen Fettsäuren Linol- und α -Linolensäure auf die Fettsäurezusammensetzung der Zellen aus?
- II Verändert sich die intrazelluläre Lokalisation der PLD in den COS-1-Zellen, nachdem diese mit Mastoparan (einem Stimulator der Granulasekretion) behandelt worden sind?
- III Wie wird die intrazelluläre Lokalisation der PLD in den COS-1 durch die Supplementierung des Zellkulturmediums mit Linol- und α -Linolensäure beeinflusst?
- IV Wird die Aktivität der PLD in beiden Zelllinien durch die Supplementierung des Zellkulturmediums mit Linol- und α -Linolensäure beeinflusst?

2 Material und Methoden

2.1 *Materialien*

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Filter	Spezialpapierfabrik Niederschlag des VEB Freiburger Zellstoff- und Papierfabrik zu Weißenborn
Kieselgel 60 HPTLC-Platten, 10 x 10 cm	Merck, Darmstadt
Kryogefäße (2 ml)	Greiner bio-one GmbH, Solingen
Petrischalen	Greiner bio-one GmbH, Solingen
Pipetten (5 ml, 10 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,25 ml; 0,5 ml; 1,5 ml)	Greiner bio-one GmbH, Solingen;
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner bio-one GmbH, Solingen
Zellkulturflaschen CELLSTAR® (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner bio-one GmbH, Solingen;
Zellkulturschalen TISSUE CULTURE (60 mm, 100 mm)	Sarstedt, Nürnbrecht

2.1.2 Geräte

Abzug S/TA/120/1297	Prutscher Laboratoriumseinrichtungen GmbH, München
Autoklav3850 ELV	Tuttnauer Systec, Wettenberg
Dünnschichtchromatographie-Kammer	Camag, Berlin
Elektrophorese-Apparatur Scie-Plas, HU10,	Herolab GmbH, Wiesloch; Carl Roth
Wide Mini Sub™ Cell	GmbH, Karlsruhe; Bio-Rad, München
Gaschromatographieanlage	
Gaschromatograph CP3800	VARIAN, Darmstadt
Autosampler 8200	VARIAN, Darmstadt
Säule Omegawax TM 320 (SUPELCO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gaschromatographie-Messröhrchen	VARIAN, Darmstadt
GSA-Zentrifugenröhrchen	Sorvall, Langenselbold

Heizrührer Variomag Multipoint HP, Variomag Monotherm SLR	Schott, Jena; H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim / München
Inkubatoren HeraCell, HeraCell 240, Function Line	Heraeus, Langenselbold
Inkubationsschüttler Unimax 1010 / Inkubator 1000	Heidolph, Kelheim
Invertmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Konfokales Lasermikroskop Leica TCS SP1	Leica Mikrosysteme, Bensheim
Molecular Imager® FX	Bio-Rad, München
PCR-Cycler T-Gradient; T1-Thermocycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter Delta 320	Mettler-Toledo, Gießen
Phosphor-Imaging Screen	Fuji, Düsseldorf
Photometer	Bio-Rad, München
Pipetten Eppendorf Research® (0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1.000 µl), Transferpette® (0,5-20 µl; 20-100 µl; 100-1.000 µl)	Eppendorf, Hamburg ; Brand, Wertheim
Pipetten (5 ml, 10 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierhilfe Akku-Jet	Brand, Wertheim
Präzisionswaage BP 221S	Sartorius, Göttingen
Spannungsgerät Consort E 802	Consort, Turnhout, Belgien
Schraubkappen mit teflonbeschichteten Dichtungen	Fa. T. Geyer, Berlin
SS-34-Zentrifugenröhrchen	Sorvall, Langenselbold
Sterilwerkbank HERA Safe	Heraeus, Langenselbold
Szintillationsröhrchen WHEATON Disposable Scintillation Vials	Fa. T. Geyer, Berlin
Szintillationszähler Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Jügesheim
Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator Syngene	VWR, Darmstadt
Videoprintanlage Gene Genius	VWR, Darmstadt
Vortex-Gerät Heidolph Reax top	Heidolph, Kelheim
Wasseraufbereitungsanlage PureLab Plus UF	ELGA LabWater, Celle
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zählkammer nach Neubauer	LO – Laboroptik-GmbH, Friedrichsdorf

Zentrifugen

Biofuge 13, 28 RS	Heraeus, Langenselbold
Biofuge	Heraeus, Langenselbold
Kühlzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg;
Kühlzentrifuge	Sorvall, Langenselbold
Minifuge	Qualitron
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Langenselbold
Rotoren SS-34, GSA	Sorvall, Langenselbold

2.1.3 Chemikalien

Acrylamid-Rotiphoese	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose NEEQ Ultra Qualität	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Antipain	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Chloroquin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DEAE-Dextran (Diethyl-aminoethyl-Dextran)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Desoxynukleosidtriphosphate	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Merck, Darmstadt
DNA-Marker (Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder)	Fermentas, St. Leon-Roth
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol 96 %	Laborchemie Apolda; Carl Roth GmbH, Karlsruhe; Fisher Scientific, Schwerte
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Cölbe; BioWest, Nuaille, Frankreich
Fettsäuresubstrate (LA, LNA)	Matreya, USA
FIM-FAME-6-Mix	Matreya, USA
Glucose	Merck, Darmstadt; Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Iod	VEB Laborchemie Apolda
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
L-Histidin	Biochrom AG, Berlin
Ladepuffer für die Elektrophorese (6 × Loading Dye)	Fermentas, St. Leon-Roth
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Mastoparan	Bachem, Heidelberg
Methanol	Fisher Scientific, Schwerte
Methanolische Salzsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
[³⁵ S]Methionin	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
[³ H]Myristinsäure	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Jügesheim
N-[Hydroxyethyl]piperazine-N-[2-ethanesulfonic acid] sodium salt (HEPES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumacetat	VEB Laborchemie Apolda
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich/Fluka, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Chemapol, Prag, Tschechien
n-Butanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Oligonukleotide	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Omegawax column test mix	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS	PAA Laboratories, Cölbe
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin; BioWest, Nuaille, Frankreich
Pepstatin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pepton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Phosphatidylbutanol	Biomol
Protein A-Sepharose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinase-Inhibitor	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNase A	Qiagen
Standard-Nähragar	Merck, Darmstadt
Szintillator	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Taq-DNA-Polymerase	Invitak
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypton	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories, Cölbe
Trypsin-Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Zellkulturmedien	
DMEM/HAM's F12	Biochrom AG, Berlin
DMEM Low Glucose	PAA Laboratories, Cölbe; BioWest, Nuaille, Frankreich
MEM	BioWest, Nuaille, Frankreich

2.1.3.1 Puffer / Lösungen

Elektrophorese-Laufpuffer:	bezogen auf 1 l: 3,082 g Tris-HCl, 14,4 g Glycin, 1 g SDS
Ethidiumbromid-Stammlösung:	1 g Ethidiumbromid ad 100 ml Aqua dest.
HEPES-Puffer:	137 mM NaCl; 3 mM KCl, 20 mM Hepes; 2 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$; 1 mM CaCl_2 ; 5,6 mM Glucose
Kanamycin-Stammlösung:	10 mg Kanamycin wurden in 1 ml Aqua bidest. gelöst und anschließend steril filtriert

2 × Laemmli-Puffer:	30 % Glycerin, 150 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,02 % Bromphenolblau
Lösung 1 (Plasmidisolation):	50 mM Glucose; 50 mM EDTA; 25 mM Tris-HCl; pH 8,0
Lösung 2 (Plasmidisolation):	0,2 mM NaOH; 1 % SDS
Lösung 3 (Plasmidisolation):	3 M Kaliumacetat
1 × PBS:	0,8 % NaCl; 0,2 % KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM K ₂ HPO ₄
Standard-Lysis-Puffer:	25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 0,5 % Triton X-100, supplementiert mit 1 mM Phenyl- methylsulfonylfluorid, 1 µg/ml Pepstatin, 5 µg/ml Leupeptin, 5 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Antipain und 50 µg/ml Trypsin- Inhibitor
1 × TAE-Puffer:	0,4 M Tris-HCl; 0,2 M Natriumacetat; 0,01 M EDTA; pH 7,8
1 × TE-Puffer:	0,01 M Tris-HCl; 0,001 M EDTA; pH 8,0
Waschpuffer I:	0,5 % Triton X-100 und 0,05 % Natrium- desoxycholat in PBS
Waschpuffer II:	500 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100 in 125 mM Tris-HCl; pH 8,0

2.1.3.2 Medien

DEH:	DMEM/HAM's F12 1:1 versetzt mit: 2 mM Glutamin; 25 mM HEPES (pH 7,4); 1,6 mM Histidin; 100 U/l Penicillin; 100 µg/l Streptomycin; 5 % FKS
------	--

DMEM low Glucose:	versetzt mit 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 10 % FKS
LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) flüssig:	10 g Trypton; 10 g Natriumchlorid; 5 g Hefeextrakt; ad 1 l Aqua dest.
LB-Medium fest:	37 g Nähragar; 5 g Trypton; 2 g Hefeextrakt; 4 g NaCl ad 1 l Aqua dest.
LB-Kanamycin-Medium:	LB-Medium nach dem Autoklavieren auf ca. 60° C abkühlen lassen und 5 ml Kanamycin-Stammlösung (10 mg/ml) steril zugeben
SOC-Medium:	2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl in 60 ml Aqua dest. lösen und autoklavieren nach dem Abkühlen hinzufügen: 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glucose; mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen und steril filtrieren; pH 7,0

2.1.3.3 Restriktionsenzyme

Tab. 3 : Verwendete Restriktionsenzyme. (Durch // wird die Stelle gekennzeichnet, an der die Phosphodiesterbindung hydrolysiert).

Restriktionsenzym	Schnittstelle (5' → 3')	Hersteller	Puffer
<i>EcoRI</i>	G // ATTC	New England Biolabs	NEBuffer EcoRI
<i>HpaI</i>	GTT // AAC	Fermentas	Blue, Tango™
<i>SmaI</i>	CCC // GGG	Fermentas	Tango™
<i>BglI</i>	A // GATCT	Fermentas	Orange, Tango™

2.1.3.4 Antikörper

mAb Anti-GFP	Clontech, Palo Alto, CA, USA
--------------	------------------------------

2.1.3.5 Kits

Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs, Berlin
--------------------------	-------------------------

2.1.3.6 Organismen und Plasmide

2.1.3.6.1 Zelllinien

Bei der caninen Mastozytomzelllinie C2 handelt es sich um nicht adhärent wachsende Zellen aus dem Mastzelltumor eines Hundes. Fragmente verschiedener Hundemastzelltumoren wurden in Mäuse injiziert (Lazarus *et al.*, 1986). Sie entwickelten sich in den Mäusen weiter (peritoneal) und konnten über vier Generationen in den Mäusen passagiert werden. Daraus wurde ein permanentes Zellkulturmodell etabliert (DeVinney *and* Gold, 1990). Diese Zellen wurden von Prof. W. M. Gold des Cardiovascular Research Institute and Department of Medicine der Universität von Kalifornien in San Francisco (USA) zur Verfügung gestellt. Die C2 weisen charakteristische Eigenschaften adulter Mastzellen auf. Sie setzen nach Stimulation Histamin und Lipidmediatoren (Prostaglandin D2) frei, weisen Chymase- und Trypsinaktivität auf und exprimieren auf ihrer Oberfläche IgE-Rezeptoren.

COS-1 (DSMZ-Nr. ACC 63) ist eine Linie adhärent wachsender, fibroblastenähnlicher unipolarer Mesenchymzellen, die aus Nierengewebe der Grünen Meerkatze (engl. *African green monkey*, lat. *Cercopithecus aethiops*) isoliert wurden (Gluzman, 1981).

2.1.3.6.2 Kompetente Zellen für die Transformation

Tab. 4:

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> HB101	<i>supE44</i> , $\Delta(mcrC-mrr)$, <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i>	(Boyer <i>and</i> Roulland-Dussoix, 1969)

2.1.3.6.3 Plasmide

Die Fusionsplasmide pEGFP-hPLD1 und pEGFP-mPLD2 zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der PLD in COS-1-Zellen wurden dankenswerter Weise von Prof. Shamshad Cockcroft vom Department of Physiology des University College London (England) zur Verfügung gestellt.

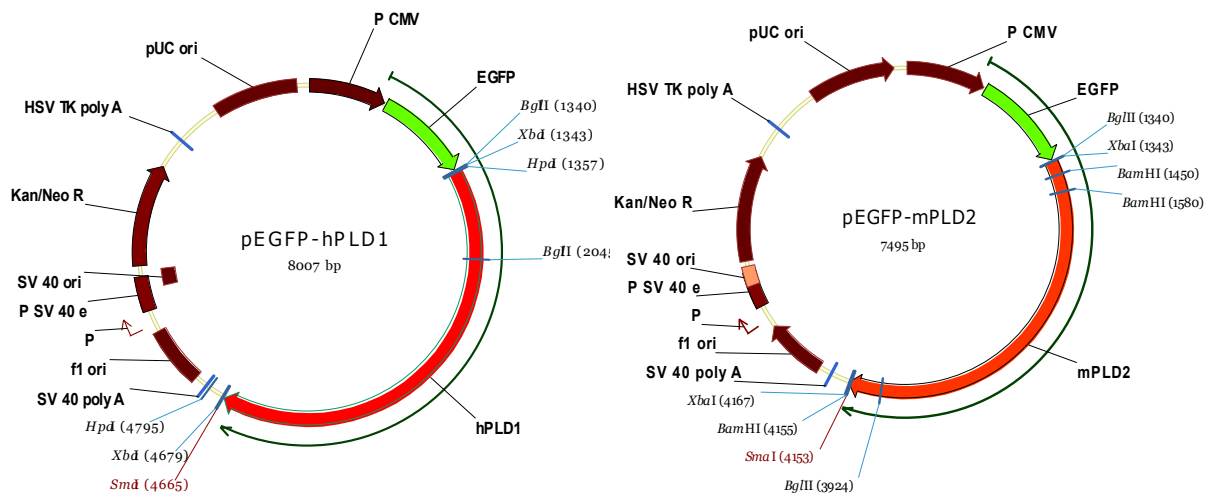


Abb. 12: Übersichtskarten der Fusionsplasmide pEGFP-hPLD1 und pEGFP-mPLD2.

Die Kollokalisationsuntersuchungen wurden mit pDsRed-GT und pDsRed-ER (Clontech, Palo Alto, Californien, USA) durchgeführt. pDsRed-ER enthält die Signalsequenz von Calreticulin als spezifischen Marker für das ER und ein C-terminales KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu)-ER-Erhaltungssignal. pDsRed-GT codiert für die N-terminalen 81 Aminosäuren der menschlichen β -1,4-Galactosyltransferase und färbt den Trans-Golgi.

2.1.4 Verwendete Software

Star 5.0	VARIAN, Darmstadt
Gene Snap	Gene Genius, SYNGENE, USA
Quantity One® 4.5.2	Bio-Rad, München
Multicalc	Wallac, Perkin Elmer, Boston, USA
Leica Confocal Software LeicaLight®	Leica Mikrosysteme, Bensheim

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung kompetenter Zellen von *Escherichia coli* HB101

Für die Herstellung transformationskompetenter Zellen wurde eine Kultur von *E. coli* HB101 in ein steriles Reagenzglas mit 2 ml flüssigem LB-Medium überführt und über Nacht bei 37° C und 200 rpm im Inkubationsschüttler bebrütet.

Am nächsten Tag wurde ein Erlenmeyerkolben mit 200 ml LB-Medium mit der Übernachtskultur beimpft und erneut bei 37° C und 150 rpm bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,5

inkubiert. Zur Messung der optischen Dichte wurde im Abstand von 30 min jeweils 1 ml Bakteriensuspension steril aus dem Erlenmeyerkolben entnommen und photometrisch gemessen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 30 min auf Eis gestellt und danach auf SS-34-Zentrifugenröhrchen verteilt. Nun wurden die Bakterien für 10 min bei 4° C und 1.912 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in je 20 ml CaCl₂-Lösung suspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Danach wurde erneut für 10 min bei 4° C und 1.912 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in 3 ml CaCl₂-Glycerin aufgenommen, suspendiert und zu 200 µl-Aliquots in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Aliquots wurden bis zur Verwendung bei -80° C gelagert.

2.2.2 Transformation der kompetenten Zellen zur Vervielfältigung der Plasmid-DNA

Für die Transfektion der COS-1-Zellen war eine ausreichende Menge an Plasmid-DNA notwendig. Dazu wurden die Plasmide in kompetente Zellen von *E. coli* HB101 transformiert.

Nachdem die kompetenten Zellen auf Eiswasser aufgetaut waren, wurden 10 µl Zellsuspension zu 0,5 ng Plasmid-DNA (in 1 × TE) gegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42° C für 2 min, danach wurden die Zellen sofort wieder auf Eis gestellt. Nun wurden die Proben mit vorgewärmtem SOC-Medium auf 1 ml aufgefüllt und 1 h bei 37° C im Inkubationsschüttler bebrütet. Je 200 µl des Ansatzes wurden auf einer LB_{Kan}-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert.

2.2.3 Übernachtkulturen für die Plasmidisolierung

Für die gewachsenen Kolonien wurden je ein steriles Reagenzglas mit 2 ml flüssigem LB_{Kan}-Medium gefüllt. Die Kolonien wurden unter sterilen Bedingungen mittels einer Pipettenspitze entnommen und in je ein Kulturröhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37° C und 200 rpm auf dem Inkubationsschüttler.

2.2.4 Plasmidisolierung im kleinen Maßstab

Um zu überprüfen, ob die gewonnenen Klone die gewünschte DNA enthielten, wurde zuerst eine Plasmidisolierung im kleinen Maßstab vorgenommen. Dafür wurde von den Übernachtkulturen je 1 ml abgenommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Rest wurde für die Plasmidpräparationen im großen Maßstab bei 4° C aufbewahrt.

Anschließend wurde bei 17.900 x g für 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde in 200 µl Lösung 1 resuspendiert. Diese Lösung enthält den Chelatbildner EDTA, der durch die Bindung von Ca^{2+} die Bakterienzellwände destabilisiert. Nun erfolgte die Zugabe von 200 µl Lösung 2. Das in dieser Lösung enthaltene SDS denaturiert die Membranen und Proteine der Bakterien. NaOH verursacht ein stark alkalisches Milieu, aufgrund dessen die DNA-Doppelstränge denaturieren. Durch vorsichtiges Schwenken des Reaktionsgefäßes wurde gemischt. Danach wurden 200 µl Lösung 3 zugegeben, erneut durch Schwenken vorsichtig gemischt und die Ansätze für 15 min auf Eis gelagert. Durch das in dieser Lösung enthaltene Kaliumacetat wird eine Absenkung des pH-Wertes verursacht, so dass die Plasmid-DNA renaturieren kann. Die Fragmente der chromosomalen DNA bilden aufgrund von Teilhomologien einen Riesenstrang, der ebenso wie die durch SDS denaturierten Proteine als Kaliumsalz ausfällt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 17.900 x g und 4° C wurde der Überstand abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Isopropanol hat ein geringeres Löslichkeitsprodukt als Wasser, wodurch die Plasmide nach der Zentrifugation als Niederschlag ausfallen. Daraufhin wurde erneut zentrifugiert (15 min, 17.900 x g, 4° C). Der Überstand wurde abgesaugt, die DNA bei 37° C getrocknet und in 30 µl Aqua bidest. aufgenommen.

2.2.5 Restriktion der Plasmid-DNA

Die gewonnene Plasmid-DNA wurde zur Kontrolle mit verschiedenen spezifischen Restriktionsenzymen behandelt. Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die DNA sequenzspezifisch schneiden und einen DNA-Doppelstrang so in Fragmente unterschiedlicher Größe zerlegen können.

Tab. 5 : Restriktionsansatz

DNA	1,0 µg
Enzym [10 U]	0,3 µl
Puffer [10 x]	2,0 µl
ddH ₂ O	ad
Gesamtansatz	20,0 µl

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Nach der Restriktion wurden die DNA-Fragmente auf einem 1 %-igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Dazu wurden 0,6 g Agarose durch Aufkochen in 60 ml einer $1 \times$ TAE-Pufferlösung geschmolzen, mit 6 μ l Ethidiumbromid (EtBr) versetzt und in eine Gelform mit Aussparungen (Geltaschen, in welche die Proben gefüllt werden) gegossen. Das Gel wurde bis zum Erstarren bei Raumtemperatur abgekühlt, wodurch sich eine homogene Matrix bildete, und anschließend mit demselben TAE-Puffer überschichtet. Jeweils 5 μ l der Restriktionsfragmente wurden mit 1 μ l $6 \times$ Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Die Restriktionsfragmente wurden bei 8 V/cm in ca. zwei Stunden elektrophoretisch getrennt und die DNA-Banden anschließend unter UV-Licht detektiert.

2.2.7 Plasmidisolation im großen Maßstab

Für die Plasmidpräparationen im großen Maßstab wurden die positiven Klone verwendet. Dazu wurde pro Kolonie ein Erlenmeyerkolben mit 100 ml flüssigem LB_{Kan}-Medium befüllt und mit der von der Übernachtskultur der Mini-Plasmidpräparation übrig gebliebenen Bakteriensuspension angeimpft. Inkubiert wurde wieder bei 37° C und 200 rpm über Nacht.

Am darauf folgenden Tag wurden jeweils 500 μ l der Bakteriensuspension abgenommen und in 500 μ l Glycerin (99 %) bei -80° C eingefroren. Die restliche Bakteriensuspension wurde in GSA-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 12.000 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, die sedimentierten Bakterien in 9 ml Lösung 1 aufgenommen, resuspendiert und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10 min wurden 18 ml Lösung 2 zugegeben, vorsichtig geschwenkt und erneut bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren 10 min wurden 13 ml Lösung 3 zugegeben und wieder vorsichtig geschwenkt. Im Anschluss wurde alles für 15 min auf Eis gestellt und danach 30 min bei 12.000 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Filter in je zwei SS-34 Röhrchen überführt, je 15 ml Isopropanol zugegeben und geschüttelt. Nun wurde wieder für 15 min bei 17.211 x g und 4° C zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Plasmide in 500 μ l 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation (15 min, 17.211 x g, 4° C) wurde der Überstand verworfen und die Plasmide bei 37° C getrocknet. Anschließend wurden die Plasmide in je 300 μ l $1 \times$ TE-Puffer aufgenommen und beide Isolate vereinigt. Zur Beseitigung eventuell vorhandener und störender RNA wurden die Präparationen für 30 min bei 37° C mit 50 μ l RNase A (1 mg/ml) behandelt.

2.2.8 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um die Plasmid-DNA für die weiteren Arbeiten zu reinigen, wurde nach deren Präparation eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurden die wässrigen DNA-Lösungen mit 1 Vol Phenol:Chloroform versetzt und kräftig geschüttelt. Durch ihre hydrophilen Gruppen bleiben Nukleinsäuren in der oberen wässrigen Phase gelöst. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 15.000 x g für 5 min. Dadurch ordnen sich in der Lösung enthaltene Proteine in der sogenannten Interphase (zwischen oberer wässriger und unterer organischer Phase) an. Die obere, wässrige Phase wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1 Vol Chloroform zugegeben. Anschließend wurde erneut kräftig geschüttelt und zentrifugiert (15.000 x g, 5 min). Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, wodurch das restliche Phenol entfernt wurde. Im Folgenden wurden 30 µl 3 M Natriumacetat und 0,7 Vol Isopropanol zugegeben und vorsichtig geschüttelt. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation (15.000 x g, 4° C) wurden die Überstände abgesaugt, die DNA mit 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen und noch einmal für 15 min bei 4° C und 15.000 x g zentrifugiert. Das Ethanol wurde anschließend abgesaugt, die DNA getrocknet und in 500 µl 1 × TE-Puffer aufgenommen.

2.2.9 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration und des Reinheitsgrades der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Photometer. Dafür wurden die Proben jeweils 1:100 mit 1 × TE-Puffer verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen 1 × TE-Puffer gemessen. Des Weiteren wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Aus beiden Werten lässt sich wie folgt der Reinheitsgrad (RG) der Lösung berechnen:

$$RG = \frac{OD_{260}}{OD_{280}}$$

Weist der RG Werte zwischen 1,7 und 2,0 auf, liegt eine ausreichend reine DNA-Lösung vor.

Ist die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm gleich 1, entspricht dies bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 ng/µl (Sambrook *et al.*, 1989). Somit lässt sich für die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration folgende Gleichung aufstellen:

$$DNA [ng / \mu l] = 260er\ Wert \cdot Verdünnung \cdot 50\ ng / \mu l$$

2.2.10 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen bei 37° C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte.

2.2.10.1 Kultivierung der adhärenenten Zelllinie COS-1

Sofern nicht anders angegeben, wurden die COS-1-Zellen in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) *low glucose*, supplementiert mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 100 U/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin kultiviert.

Bei einer Konfluenz von 90 – 100 % wurden die adhärenenten Zellen umgesetzt. Dazu wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen vorsichtig mit 5 ml PBS gespült und mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung behandelt. Anschließend wurden die Zellen bei 37° C inkubiert, bis sie sich vom Flaschenboden gelöst hatten. Die Trypsin-Wirkung wurde durch Zugabe von 2 ml Kulturmedium gestoppt, die Zellen aus der Flasche gespült, in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 711 x g und 4° C für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit neuem Medium 1:10 geteilt und in neue Zellkulturflaschen mit 10 ml Kulturmedium überführt.

2.2.10.2 Kultivierung der caninen Suspensionszelllinie C2

Sofern nicht anders angegeben, wurden die C2-Zellen in DMEM/HAM's F12 1:1 (DEH), supplementiert mit 5 % FKS, 25 mM HEPES (pH 4,7), 1,6 mM Histidin, 100 U/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin kultiviert. Da dieses Medium bereits 0,14 µM Linolsäure (LA) enthielt, wurde 0,14 µM α-Linolensäure (ALA) gelöst in Ethanol (Endkonzentration 0,1 %) zugegeben. Des Weiteren wurden 5 µmol/l α-Tocopherol zugesetzt.

Die Kultivierungsdauer der Suspensionszellen betrug 4 Tage. Für die Ernte wurden die Zellen aus der Kulturflasche gespült, in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 311 x g und 4° C für 6 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 20 ml PBS gewaschen und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Zur Weiterkultivierung wurden $1,25 \times 10^7$ Zellen mit 10 ml Kulturmedium suspendiert und in die Zellkulturflasche gegeben. Nach 4 Tagen wurden 15 ml frisches Kulturmedium zugegeben.

2.2.11 Mykoplasmennachweis mit dem Venor®GeM Mycoplasma Detection Kit

Mykoplasmen sind ein weit verbreitetes Problem für Zellkulturen. Neben den pathogenen Eigenschaften der Mykoplasmen spielt die Infektion von Zellkulturen mit diesen Organismen (hpts. *Mycoplasma orale*) eine wichtige Rolle, besonders da sie sich aufgrund ihrer geringen Größe im Gegensatz zu anderen Bakterien nicht durch Sterilfilter der Porengröße 0,45 µm zurückhalten lassen und auch Antibiotika nicht wirken. Mykoplasmen führen zwar nicht zum Absterben der Zellen, beeinflussen aber deren Lebensfähigkeit, Wachstum, Stoffwechsel und Morphologie. Um eine Infektion der Zellkulturen mit Mykoplasmen ausschließen zu können, wurde ein PCR-Testkit verwendet. Vorher wurden die Zellen für 2 Passagen in antibiotikafreiem Medium kultiviert, um keine Verfälschung der Testergebnisse zu verursachen. Die Kulturen wurden bei 90 – 100 % Konfluenz getestet.

Dazu wurden 100 µl Zellkulturüberstand abgenommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Probe für 5 min bei 100° C gekocht und kurz bei 1.900 x g abzentrifugiert. Vom Überstand wurden nun 2 µl für die Amplifikation verwendet.

Tab. 6: Reaktionsmix für den Mykoplasmentest

DNA	2,00 µl
ddH ₂ O	35,05 µl
MgCl ₂	0,75 µl
Reaktionspuffer	5,00 µl
Primer-dNTP-Mix	5,00 µl
Interne Kontrolle	2,00 µl
Taq-Polymerase	0,20 µl
Gesamtansatz	50,00 µl

PCR-Programm:

Denaturierung	94° C	2 min
Annealing	55° C	2 min
Elongation	72° C	2 min
Denaturierung	94° C	30 s
Annealing	55° C	1 min
Elongation	72° C	1 min
	Zyklen	34
Final Step	72° C	4 min

Im Anschluss an die PCR wurden die Proben auf einem 1%-igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt und unter UV-Licht detektiert.

2.2.12 Fettsäurensupplementierung der Zellkulturmedien

Um den Einfluss von n3- und n6-Fettsäuren auf die PLD zu untersuchen, wurden die Grundmedien (DMEM bei COS-1- und DEH bei C2-Zellen, Tab. 7) mit Linol- (LA) oder α -Linolensäure (ALA) in einer Endkonzentration von 14 μ M (DEH) und 20 μ M (DMEM) supplementiert. Außerdem wurden den Medien zusammen mit den Fettsäuren 5 μ mol/l α -Tocopherol zugesetzt. Die Fettsäuren und das α -Tocopherol wurden in Ethanol gelöst. Die Endkonzentration an Ethanol betrug 0,1 %. Als Kontrollmedium diente ein nur mit α -Tocopherol und Ethanol versetztes Medium. Die Zellen wurden für mindestens eine Passage in diesen Medien kultiviert, bevor Versuche mit ihnen durchgeführt wurden.

Tab. 7: Bezeichnung der Medien mit und ohne Fettsäurensupplementierung. Bei den C2-Zellen war kein separates Kontrollmedium nötig, da dem Grundmedium in Ethanol gelöstes α -Tocopherol zugegeben wurde.

Zugabe	COS-1-Zellen	C2-Zellen
ohne	DMEM	DEH
Kontrollmedium	DMEM-EtOH	—
Linolsäure (n6)	DMEM-LA	DEH-LA
α -Linolensäure (n3)	DMEM-ALA	DEH-ALA

2.2.13 Fettsäurenbestimmung

Nach der Kultivierung der Zellen in den Fettsäuren-supplementierten Medien erfolgte die Untersuchung ihrer Fettsäurezusammensetzung. Dafür wurden die Zellen aus den Kulturflaschen entnommen und mit 5 ml PBS gewaschen. Die Zellsuspension wurde auf 1×10^7 (C2) bzw. 5×10^6 (COS-1) Zellen pro Probe eingestellt. Nach der anschließenden Zentrifugation bei $256 \times g$ und 4°C für 6 min wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment in 1 ml Aqua bidest. aufgenommen. Die Proben wurden bei -80°C bis zur Messung gelagert.

Die Messung der Fettsäurezusammensetzung erfolgte mittels Gaschromatographie. Die Proben wurden nach einer modifizierten Ein-Schritt-Methode (Sonnichsen *and* Muller, 1999), bei der eine vorangestellte Lipidextraktion nicht nötig ist, bearbeitet (Seidel *et al.*, 2005). Die Zellsedimente wurden für 18 h bei 1 mbar lyophilisiert und anschließend mit 500 μl methanolischer Salzsäure zur Umesterung, 250 μl n-Hexan zur Extraktion und 500 μl Internem Standard (L- α -Phosphatidylcholin-C17:0) versetzt. Der Veresterungsprozess erfolgte für 30 min bei 80°C im Wasserbad. Nach dem Abkühlen der Proben bei Raumtemperatur wurden nochmals 500 μl n-Hexan und 1 ml Aqua bidest. zugegeben. Die Proben wurden 1 min geschüttelt und anschließend 10 min bei $3112 \times g$ und 15°C zentrifugiert. Die obere Hexanphase konnte nun abgenommen und unter Stickstoff eingeeengt werden. Anschließend wurden die Fettsäurenmethylester (FAME) in 60 μl n-Hexan aufgenommen, 10 s geschüttelt und in spezielle Gaschromatographie (GC)-Messröhrchen überführt. Die Messröhrchen wurden bis zur Messung bei -25°C aufbewahrt.

Die Messung und Quantifizierung der FAME erfolgte am Gaschromatographen 3800 VARIAN auf einer Omegawax TM 320-Trennsäule. Die Aufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit dem Programm Star 5.0[®] von VARIAN unter Nutzung des Internen Standards als Referenzpeak, anhand dessen die relativen Retentionszeiten der Fettsäuren ermittelt wurden. Nach der Blindwertkorrektur erfolgte die Umrechnung der Konzentrationen der FAME auf die Konzentration der Fettsäuren in $\text{nmol FS}/1 \times 10^7$ Zellen mittels der molaren Massen. Die jeweiligen Methylester der Fettsäuren enthalten ein Kohlenstoffatom und zwei Wasserstoffatome zusätzlich. Sie besitzen also eine molare Masse berechnet aus der molaren Masse der Fettsäure plus 14,03 g/mol. Zusätzlich wurden die Konzentrationen der ermittelten Fettsäuren in Gewichtsprozent (Gew.-%) angegeben.

2.2.14 Transfektion der COS-1-Zellen mit DEAE-Dextran

Die C2-Zellen waren aufgrund der Tatsache, dass es sich um Suspensionszellen handelt, sehr schlecht transfizierbar. Deshalb konnte die Transfektion einschließlich der anschließenden konfokalen Auswertung nur bei den adhärennten COS-1-Zellen durchgeführt werden.

DEAE-Dextran ist ein polykationisches Transfektionsreagenz, das aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat von Nukleinsäuren Komplexe bildet. Diese Komplexe binden an die negativ geladene Zelloberfläche und können so von den Zellen durch Endozytose aufgenommen werden.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen so in Kulturschalen (60 mm für die konfokale Analyse oder 100 mm für die Immunpräzipitation) ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 40 – 50 % erreichten. Um konfokale Analysen durchführen zu können, wurden kleine Deckgläschen steril in die Kulturschalen gelegt und mit der Zellsuspension überschichtet. Die Zellen konnten sich so auf den Deckgläschen anheften und für die Mikroskopie entnommen werden.

Für die Transfektion wurden zwei Reaktionsgefäße mit je 750 µl Transfektionsmedium (DMEM ohne FKS) befüllt. In das eine Reaktionsgefäß wurden zudem ca. 5 ng Plasmid-DNA gegeben, in das andere wurden 10 µl DEAE-Dextran (50 mg/ml) pipettiert. Es schloss sich eine Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur an. Danach wurde die DEAE-Dextran-Lösung zu der Plasmid-Lösung gegeben und weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit konnten sich die DEAE-DNA-Komplexe ausbilden.

Zwischenzeitlich wurde das Kulturmedium von den Zellen abgesaugt und diese mit 2 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die DEAE-DNA-Komplexe vorsichtig auf die Zellen pipettiert und die Schalen 90 min bei 37° C inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Schalen alle 15 min geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Komplexe auf den Zellen zu gewährleisten. Anschließend wurde das Transfektionsmedium mit den DEAE-DNA-Komplexen abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit 2 ml PBS gewaschen und 5 ml frisches Kulturmedium (mit 10 % FKS) zugegeben, dem Chloroquin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt wurde. Chloroquin hemmt die lysosomalen DNAsen und verhindert damit den Abbau der in die Zellen eingeschleusten DNA. Es folgte eine weitere Inkubation für 3 h bei 37° C. Danach wurde die Lösung abgesaugt, die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und 5 ml neues Kulturmedium zugegeben. Die transfizierten Zellen mussten nun für 48 h bei 37° C inkubiert werden.

2.2.15 Konfokale Lasermikroskopie

Zwei Tage nach der Transfektion wurden die mit den Fusionsplasmiden transfizierten Zellen im konfokalen Lasermikroskop Leica TCP SP11 mit einem $\times 63$ Wasser-Planapochromat-Objektiv fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und fotografiert. Für die konfokalen Analysen wurde die Leica Confocal Software LeicaLight[®] verwendet.

Tab. 8: Optimale Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome

Fluorochrom	Absorption [nm]	Max. Emission [nm]	Laser
GFP	476	510	Argon
DsRed	543	582	Argon

Die Zellen wurden einerseits im unstimulierten Zustand betrachtet und andererseits für 45 min mit Mastoparan in einer Endkonzentration von 25 μM stimuliert.

2.2.16 Immunpräzipitation transfizierter Zellen

Biochemische Untersuchungen wurden 48 h nach der Transfektion der Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und für 2 h in methioninfreiem MEM (engl.: *minimal essential Medium*) inkubiert, um den intrazellulären Methionin-Vorrat aufzubrechen. Da Methionin von den meisten Säugerzellen nicht synthetisiert werden kann, diese Aminosäure aber für den Start jeder Proteinbiosynthese essentiell ist (Startcodon „AUG“), wird in dieser Zeit ein Großteil des in den Zellen vorhandenen Methionin-Pools abgebaut und die Proteinbiosyntheserate gesenkt. Anschließend wurden die Zellen nochmals mit 5 ml PBS gewaschen und in 3,5 ml methioninfreiem MEM aufgenommen. Dem Medium wurden nun 80 μCi [³⁵S]Methionin zugegeben. Während der anschließenden 6-stündigen Inkubationszeit wurden neue Proteine synthetisiert, die nun das radioaktiv markierte Methionin aufgenommen hatten. Nach 5 h wurde ein Teil der Zellen mit 25 μM Mastoparan stimuliert, der andere Teil erhielt als Kontrolle PBS.

Für die Lyse der Zellen wurde das Medium abgenommen und in 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden 50 μl Proteinase-Inhibitor und 1 ml Standard-Lysis-Puffer auf die Zellen gegeben, wobei auf Eis gearbeitet wurde. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturschalen gelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, welche 30 min bei 4° C vorsichtig geschwenkt wurden. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (15 min, 4° C, 1.900 x g) entfernt. Die Überstände mit den gelösten Proteinen wurden in neue Reaktionsgefäße über-

führt und 50 µl Protein A-Sepharose (PAS)-Beads zur „Vorreinigung“ zugegeben. Proteine, die unspezifisch an die Beads gebunden haben, konnten nach einer 2-stündigen Inkubation bei 4° C und vorsichtigem Schwenken durch einen kurzen Zentrifugationsschritt (1 min, 4° C, 1.900 x g) entfernt werden. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und 10 µl Anti-GFP-Antikörper zugegeben. Es schloss sich eine weitere 2-stündige Inkubation bei 4° C und vorsichtigem Schwenken an. Danach wurden erneut 50 µl PAS zugegeben und für 2 h bei 4° C geschwenkt. Nach erneuter Zentrifugation (1 min, 4° C, 1.900 x g) wurde der Überstand verworfen und die Beads mit den gebundenen Protein-Antikörper-Komplexen dreimal in Waschpuffer I und dreimal in Waschpuffer II gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Eluierung der Proteine erfolgte in 80 µl 2 × Laemmli-Puffer mit 1 % SDS zur Denaturierung der Proteine und 1 % Dithiothreitol (DTT) zum Auflösen der Disulfidbrücken in den Proteinen durch 5-minütiges Kochen bei 95° C.

Die bei der Immunpräzipitation gewonnenen Proteine wurden anschließend durch eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt (Laemmli, 1970).

2.2.17 SDS-PAGE

Das Polyacrylamidgel setzte sich aus einem Trenn- und einem Sammelgel zusammen (Laemmli, 1970).

Tab. 9: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-PAGE.

	Trenngel	Sammelgel
A. dest.	16,5 ml	15,6 ml
Acrylamid	6,2 ml	3,9 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	7,7 ml	2,9 ml
SDS	310,0 µl	230,0 µl
TEMED	23,0 µl	23,0 µl
APS	310,0 µl	230,0 µl

Die Auftrennung der Proteine erfolgte über Nacht bei 7 mA/Gel in Elektrophorese-Laufpuffer. Zur Abschätzung der Proteingröße wurde ein Größenmarker mit aufgetragen. Die Anfärbung der Gele erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung für 20 min. Anschließend wurden die Gele bis zur Sichtbarkeit der Markerbanden in 25 % Isopropanol und 10 % Essigsäure entfärbt. Abschließend wurden die Gele vakuumgetrocknet und auf einem Phosphorimaging Screen entwickelt. Nach 2 Tagen wurden die Screens mit einem Phosphorimager gescannt und ausgewertet.

2.2.18 PLD-Assay (modifiziert nach Sarri *et al.* 2003)

Für die Messung der PLD-Aktivität wurden einen Tag vor dem Assay 1×10^6 Zellen in eine Zellkulturschale (60 mm) ausgesät.

Am darauf folgenden Tag wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und 900 µl HEPES-Puffer (pH 7,2) zugegeben. Anschließend wurde 1 µCi [3 H]Myristinsäure in 100 µl HEPES-Puffer zu den Zellen gegeben. Nach 1 h Inkubation bei 37° C wurde die [3 H]Myristinsäure entfernt und durch 900 µl HEPES-Puffer mit 0,5 % n-Butanol ersetzt. Zur Stimulation der Zellen wurde anschließend Mastoparan in einer Endkonzentration von 25 µM zu den Zellen gegeben. Zur Kontrolle wurden Zellen mitgeführt, die mit dem gleichen Volumen an PBS anstelle des Mastoparans versetzt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 45 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl eiskalter Methanol-Salzsäure-Lösung (98:2, v/v) gestoppt, die Zellen mit einem Zellschaber vom Kulturschalenboden gelöst und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nun wurden 500 µl Methanol und 1 ml Chloroform zugegeben, die Schalen mit 1 ml Aqua bidest. gespült und dieses auch zu den Proben in den Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei $3.445 \times g$ wurde die untere (organische) Phase entnommen, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit Stickstoff eingengt und in 20 µl Chloroform aufgenommen.

2.2.19 Dünnschichtchromatographie

Mittels präparativen Kieselgel HPTLC 60-Patten (10 x 10 cm) erfolgte die Trennung der durch die PLD gebildeten Fraktionen von Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylbutanol (PBut). Zur Vorbereitung wurden die Platten mit einer Phosphorsäure-haltigen (0,5 %) Methanol-Lösung gewaschen und anschließend über 20 min bei 120° C erhitzt.

Auf eine Platte wurden jeweils 6 Proben und der Standard (ein Gemisch aus PC und PBut) linear aufgetragen. Anschließend wurde die Platte in eine horizontale Trennkammer gelegt und die Lipide mit 6 ml Laufmittel, bestehend aus Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser (75:45:3:0,4), getrennt. Nach der darauf folgenden Trocknung wurden die Platten mit Iod bis zur Sichtbarkeit der Lipidfraktionen entwickelt. Die mit den Standards korrespondierenden Banden wurden anschließend abgekratzt, in mit 6 ml Szintillatorflüssigkeit gefüllte Messgefäße überführt und im Szintillationszähler gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Fettsäurezusammensetzung der untersuchten Zelllinien

Für die Messung der Fettsäurezusammensetzung beider Zelllinien wurden diese einerseits in Grundmedium (DMEM oder DEH) und andererseits in mit Linolsäure (DMEM-LA oder DEH-LA) oder α -Linolensäure (DMEM-ALA oder DEH-ALA) versetztem Medium kultiviert. Die Fettsäuren wurden dem Grundmedium in einer Endkonzentration von 14 μ M (C2-Zellen) bzw. 20 μ M (COS-1-Zellen) zugegeben. Der Einbau der Fettsäuren in die Zellen wurde 4 Tage nach der Supplementierung mittels Gaschromatographie gemessen. Dabei wurde besonderer Wert auf die Fettsäurezusammensetzung der n3- und n6-Fettsäurefamilien gelegt, um die Unterschiede zwischen der Supplementierung mit LA und ALA herauszustellen.

3.1.1 Fettsäuremuster bei COS-1-Zellen

Die Zugabe von Linol- bzw. α -Linolensäure zu den Zellkulturmedien führte zu folgenden Veränderungen im Fettsäuremuster der COS-1-Zellen (Abb. 13):

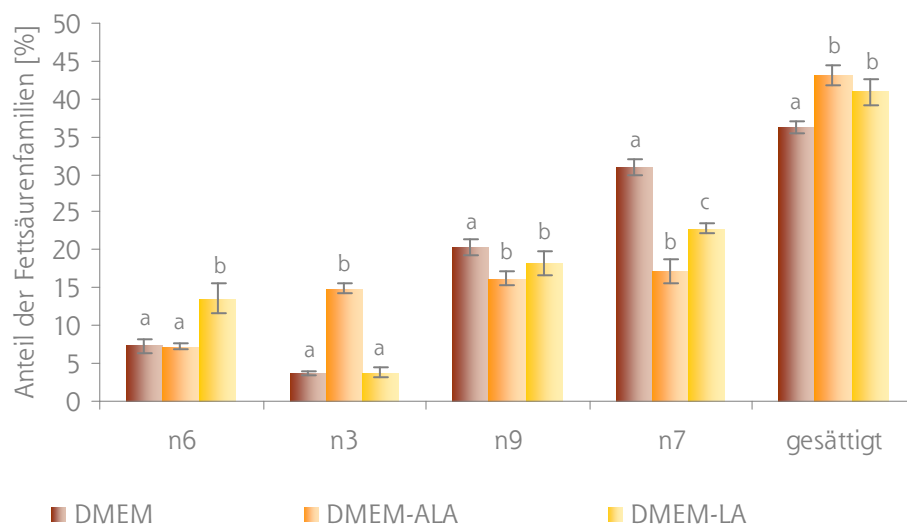


Abb. 13: Anteile der Fettsäurefamilien im Fettsäuremuster der COS-1 nach 4 Tagen Kultivierung in den unterschiedlich supplementierten Medien. Dargestellt sind MW \pm SD der Fettsäurefamilien der COS-1, die in den Medien DMEM, DMEM-ALA und DMEM-LA kultiviert wurden. n = 6. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). DMEM – Grundmedium, DMEM-ALA – α -linolensäuresupplementiertes Medium, DMEM-LA – linolsäuresupplementiertes Medium.

Der Zusatz der jeweiligen Fettsäure zum Grundmedium spiegelt sich nach der viertägigen Kultivierung der Zellen in deren Fettsäurenmuster wider. So wurde bei den COS-1-Zellen ein deutlich höherer Einbau der entsprechenden Fettsäure im Vergleich zum Grundmedium gemessen, wobei sich der prozentuale Anteil an ALA nach deren Zugabe stärker erhöhte (Tab. 10), als der prozentuale Anteil an LA nach LA-Supplementierung. Auch die Gesamt-Fettsäurenkonzentration der n3-Fettsäuren war nach ALA-Supplementierung höher als die Gesamt-Fettsäurenkonzentration der n6-Fettsäuren nach LA-Supplementierung.

Die Zugabe von α -Linolensäure (DMEM-ALA) bewirkte im Vergleich zum Grundmedium (DMEM) einen signifikant höheren Einbau der n3-Fettsäuren ($14,9 \% \pm 0,66$ vs. $3,61 \% \pm 0,29$) in die Zellen, was hauptsächlich durch ALA verursacht wurde (Tab. 10). Die n6-Fettsäuren blieben in diesem Medium unbeeinflusst ($7,27 \% \pm 0,43$ vs. $3,31 \% \pm 0,92$), wogegen die n7- ($17,21 \% \pm 1,65$ vs. $30,87 \% \pm 1,05$) und n9-Fettsäuren ($16,23 \% \pm 0,87$ vs. $20,43 \% \pm 1,05$) im Vergleich zum Grundmedium signifikant erniedrigt waren. Der Gehalt an gesättigten Fettsäuren stieg im DMEM-ALA gegenüber DMEM signifikant an (von $36,19 \% \pm 0,75$ auf $43,12 \% \pm 1,4$; Abb. 13).

Die Zugabe von Linolsäure (DMEM-LA) bewirkte hingegen einen signifikanten Anstieg aller n6-Fettsäuren ($13,58 \% \pm 2,02$ vs. $7,31 \% \pm 0,92$) im Vergleich zum Grundmedium, was hauptsächlich durch LA verursacht wurde (Tab. 10). In diesem Medium blieben die n3-Fettsäuren unbeeinflusst ($3,78 \% \pm 0,73$ vs. $3,6 \% \pm 0,29$). Die n9-Fettsäuren ($18,27 \% \pm 1,62$ vs. $20,43 \% \pm 1,05$) und die n7-Fettsäuren ($22,87 \% \pm 0,57$ vs. $30,87 \% \pm 1,09$) waren signifikant erniedrigt gegenüber DMEM. Der Gehalt an gesättigten Fettsäuren war gegenüber DMEM signifikant erhöht ($40,95 \% \pm 1,77$ vs. $36,19 \pm 0,75$; Abb. 13).

Durch die Supplementierung änderte sich das n6 : n3-Fettsäurenverhältnis von 1,0 : 2,0 im DMEM auf 2,0 : 1,0 im DMEM-ALA und auf 1,0 : 3,4 im DMEM-LA.

In Tab. 10 sind die Ergebnisse der gaschromatographischen Fettsäurenbestimmung für die n3- und die n6-Familie im Einzelnen aufgeführt. Nach ALA-Zugabe war der größte Anstieg bei ALA selbst zu verzeichnen. Aber auch der Gehalt an Eicosatriensäure (C 20:3n3) und Docosatetraensäure (C 22:4n3) nahm signifikant zu. Nach LA-Supplementierung nahm der Gehalt an LA in den Zellen stark zu, aber auch die Gehalte an Eicosadiensäure (C 20:2n6) und Docosadiensäure (C 22:2n6) stiegen signifikant.

Tab. 10: n3- und n6-Fettsäurenzusammensetzung der COS-1-Zellen nach 4 Tagen Kultivierung in den unterschiedlich supplementierten Medien. Dargestellt sind MW \pm SD. n = 6. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede. DMEM – Grundmedium, DMEM-ALA – α -linolensäuresupplementiertes Medium, DMEM-LA – linolsäuresupplementiertes Medium, FS [%] – Gew.-% der gemessenen Fettsäure, SD – Standardabweichung.

Bezeichnung	Name	DMEM		DMEM-ALA		DMEM-LA	
		FS [%] \pm SD		FS [%] \pm SD		FS [%] \pm SD	
18:3n3	α -Linolensäure	0,17 \pm 0,02	a	6,00 \pm 0,70	b	0,26 \pm 0,11	a
18:4n3	Octadecatetraensäure	0,01 \pm 0,01	a	0,02 \pm 0,03	a	0,03 \pm 0,03	a
20:3n3	Eicosatriensäure	0,08 \pm 0,03	a	3,64 \pm 0,44	b	0,18 \pm 0,11	a
20:4n3	Eicosatetraensäure	—		0,04 \pm 0,02		—	
20:5n3	Eicosapentaensäure	0,24 \pm 0,02	a	0,36 \pm 0,05	b	0,02 \pm 0,02	c
22:3n3	Docosatriensäure	—		0,42 \pm 0,06		—	
22:4n3	Docosatetraensäure	—		1,78 \pm 0,31		—	
22:5n3	Docosapentaensäure	1,37 \pm 0,09	a	1,11 \pm 0,08	b	0,22 \pm 0,07	c
22:6n3	Docosahexaensäure	1,74 \pm 0,21	a	1,55 \pm 0,15	a	1,39 \pm 0,26	a
Σ n3 _{gesamt}		3,60 \pm 0,29	a	14,90 \pm 0,66	b	2,10 \pm 0,45	a
18:2n6	Linolsäure	3,74 \pm 0,28	a	3,77 \pm 0,29	a	8,98 \pm 2,15	b
18:3n6	γ -Linolensäure	0,03 \pm 0,02	a	0,08 \pm 0,02	b	0,07 \pm 0,01	b
20:2n6	Eicosadiensäure	0,25 \pm 0,02	a	0,27 \pm 0,04	a	1,07 \pm 0,47	b
20:3n6	Dihomo- γ -Linolensäure	0,44 \pm 0,12	a	0,41 \pm 0,05	a	0,39 \pm 0,13	a
20:4n6	Arachidonsäure	2,33 \pm 0,52	a	2,32 \pm 0,10	a	2,27 \pm 0,70	a
22:2n6	Docosadiensäure	0,14 \pm 0,02	a	0,14 \pm 0,01	a	0,28 \pm 0,10	b
22:4n6	Docosatetraensäure	0,38 \pm 0,06	a	0,29 \pm 0,03	b	0,51 \pm 0,15	a
Σ n6 _{gesamt}		7,31 \pm 0,92	a	7,27 \pm 0,43	a	13,58 \pm 2,02	b

3.1.2 Fettsäurenmuster bei C2-Zellen

Auch bei den C2-Zellen wurde ein höherer Einbau der supplementierten Fettsäuren im Vergleich zum Grundmedium (DEH) gemessen, wobei der Anteil an ALA nach deren Zugabe wesentlich geringer war, als bei den COS-1-Zellen und als der Anteil an LA nach LA-Supplementierung. Die Metabolite der supplementierten Fettsäuren waren zum Teil deutlich erhöht. Das Niveau der gesättigten Fettsäuren änderte sich in den unterschiedlichen Medien nur geringfügig.

Die Supplementierung des Mediums mit ALA (DEH-ALA) bewirkte einen signifikanten Anstieg der n3-Fettsäuren (6,94 % \pm 0,49 vs. 0,72 % \pm 0,07; Anstieg: 9,6-fach), verglichen mit dem Grundmedium (Tab. 11). Am deutlichsten zeigte sich dies bei der Eicosatetraensäure

(ETA, C20:4n3), die im Vergleich zum DEH um ca. das 40-fache erhöht war (Tab. 11). Der Gehalt an n6-Fettsäuren ($2,29 \% \pm 0,06$ vs. $1,97 \% \pm 0,04$) war in diesem Medium signifikant erhöht gegenüber DEH. Die prozentualen Anteile an n7- ($24,41 \% \pm 1,14$ vs. $24,41 \% \pm 1,14$) und n9-Fettsäuren ($29,26 \% \pm 2,14$ vs. $34,54 \% \pm 0,13$) verringerten sich dagegen im Vergleich zum DEH (Abb. 14).

Die Supplementierung des Mediums mit LA (DEH-LA) bewirkte einen signifikant höheren Einbau von n6-Fettsäuren ($8,82 \% \pm 0,64$ vs. $1,97 \% \pm 0,04$) in die Zellen (Abb. 14). Der Anteil an n3-Fettsäuren ($1,01 \% \pm 0,11$ vs. $0,72 \% \pm 0,07$) war nur geringfügig erhöht. Der Gehalt an n9-Fettsäuren ($28,33 \% \pm 1,85$ vs. $34,54 \% \pm 0,13$) war in diesem Medium etwa 1,2-fach geringer als im Grundmedium (DEH). Auch wurden weniger n7-Fettsäuren ($23,66 \% \pm 1,28$ vs. $25,29 \% \pm 0,15$) eingebaut. Tab. 11 zeigt den Anteil der einzelnen n3- und n6-Fettsäuren in den Zellen. Die Supplementierung des Mediums mit LA (DEH-LA) bewirkte einen signifikanten Anstieg von LA und ihren Metaboliten γ -Linolensäure (GLA, C18:3n6) und Dihomo- γ -Linolensäure (DGLA, C20:3n6). Eine Zunahme des Arachidonsäure (AA)-gehaltes konnte nicht festgestellt werden.

Im Folgenden sind die Effekte der Zugabe von LA bzw. ALA auf das Fettsäurenmuster der C2-Zellen dargestellt.

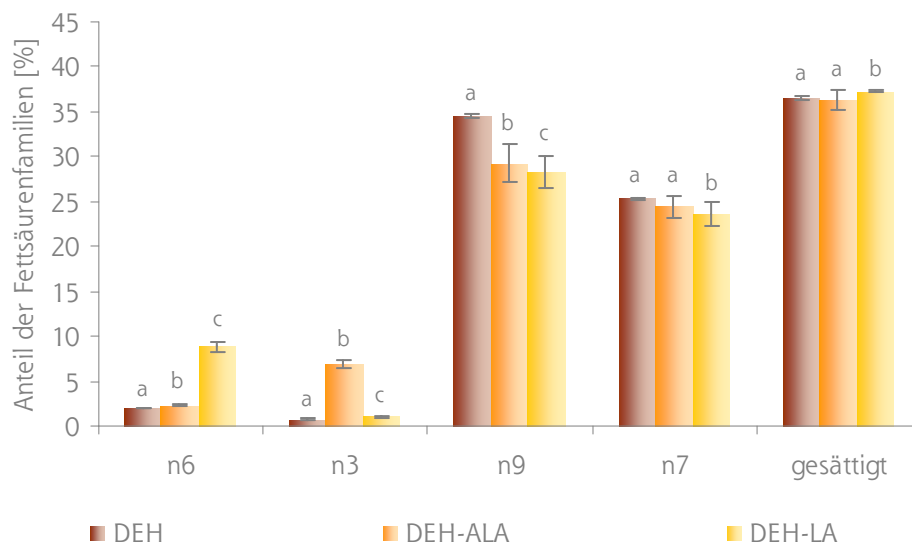


Abb. 14: Anteile der Fettsäurefamilien im Fettsäurenmuster der C2-Zellen nach 4 Tagen Kultivierung in den unterschiedlich supplementierten Medien. Dargestellt sind MW \pm SD der Fettsäurefamilien der C2, die in den Medien DMEM, DMEM-ALA und DMEM-LA kultiviert wurden. n = 6. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). DEH – Grundmedium, DEH-ALA – α -linolensäuresupplementiertes Medium, DEH-LA – linolensäuresupplementiertes Medium.

Tab. 11: n3- und n6-Fettsäurenzusammensetzung der C2-Zellen nach 4 Tagen Kultivierung im jeweiligen Medium Dargestellt sind MW \pm Stabw. n = 6. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). DEH – Grundmedium, DEH-ALA – α -linolensäuresupplementiertes Medium, DEH-LA – linolensäuresupplementiertes Medium, FS [%] – Gew.-% der gemessenen Fettsäure, SD – Standardabweichung.

Bezeichnung	Name	DEH		DEH-ALA		DEH-LA	
		FS [%] \pm SD		FS [%] \pm SD		FS [%] \pm SD	
18:3n3	α -Linolensäure	—		0,03 \pm 0,01		—	
20:4n3	Eicosatetraensäure	0,11 \pm 0,00	a	4,49 \pm 0,40	b	0,19 \pm 0,09	a
20:5n3	Eicosapentaensäure	0,16 \pm 0,04	a	0,83 \pm 0,10	b	0,16 \pm 0,02	a
22:5n3	Docosapentaensäure	0,13 \pm 0,07	a	0,86 \pm 0,03	b	0,24 \pm 0,02	c
22:6n3	Docosahexaensäure	0,31 \pm 0,02	a	0,60 \pm 0,04	b	0,43 \pm 0,02	c
Σ n3 _{gesamt}		0,72 \pm 0,07	a	6,94 \pm 0,49	b	1,01 \pm 0,11	c
18:2n6	Linolsäure	0,62 \pm 0,03	a	0,80 \pm 0,06	b	1,63 \pm 0,28	c
18:3n6	γ -Linolensäure	0,06 \pm 0,01	a	0,05 \pm 0,01	b	0,27 \pm 0,03	c
20:3n6	Dihomo- γ -Linolensäure	0,66 \pm 0,01	a	0,71 \pm 0,02	b	6,08 \pm 0,36	c
20:4n6	Arachidonsäure	0,49 \pm 0,02	a	0,65 \pm 0,05	b	0,68 \pm 0,05	b
22:4n6	Adrensäure	0,02 \pm 0,01	a	0,04 \pm 0,01	b	0,06 \pm 0,01	c
Σ n6 _{gesamt}		1,97 \pm 0,04	a	2,29 \pm 0,06	b	8,82 \pm 0,64	c

3.2 Intrazelluläre Lokalisation der PLD-Isoformen unter dem Einfluss von Mastoparan und verschiedenen Fettsäurensupplementen

3.2.1 Intrazelluläre Lokalisation der PLD bei im Grundmedium kultivierten COS-1

In den weiteren Untersuchungen sollte gezeigt werden, welchen Einfluss die verschiedenen Fettsäurensupplementierungen und das Zellstimulanz Mastoparan auf die intrazelluläre Lokalisation beider PLD-Isoformen ausüben. Dafür wurden COS-1-Zellen mit den grün fluoreszierenden Fusionsplasmiden pEGFP-hPLD1 bzw. pEGFP-mPLD2 transient transfiziert. Die Auswertung erfolgte 48 h nach der Transfektion mittels eines konfokalen Lasermikroskops (Leica TCP SPII) mit einem 63 \times Wasser-Planapochromat-Objektiv.

3.2.1.1 Lokalisation von PLD1 bei im Grundmedium kultivierten COS-1

Die Transfektionsexperimente zeigten PLD1-GFP in unstimulierten COS-1-Zellen (Abb. 15, linkes Bild) hauptsächlich perinukleär in zellulären Vesikeln, wobei festgestellt werden konnte, dass die Fluoreszenzsignale vorwiegend in der Golgi-Region auftraten. Bei Zellen, die im Grundmedium (DMEM) kultiviert wurden, konnte nach der Stimulation mit Mastoparan ($c = 25 \mu\text{M}$) eine starke Verschiebung des Fluoreszenzsignals von PLD1 beobachtet werden. Der Hauptanteil von PLD1-GFP war nicht mehr in intrazellulären vesikulären Strukturen zu beobachten, sondern befand sich an der Plasmamembran (Abb. 15, rechtes Bild). Nur ein Teil der Vesikel verblieb in der Golgi-Region oder vesikulär in der Zelle.

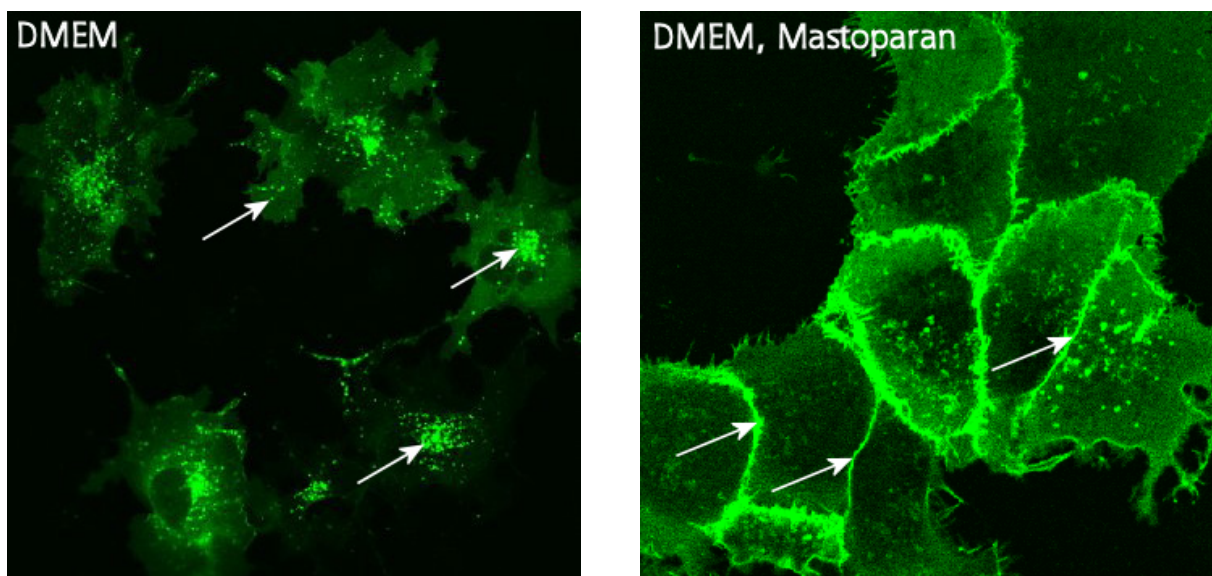


Abb. 15: Lokalisation von PLD1-GFP in transient transfizierten COS-1, kultiviert im Grundmedium (DMEM), vor und nach der Stimulation mit Mastoparan. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion für 1 h mit Mastoparan stimuliert ($25 \mu\text{M}$) und mikroskopiert. Nach der Stimulation findet eine weitgehende Translokation von PLD1-GFP zur Plasmamembran statt.

Aus der Literatur sind sehr unterschiedliche Angaben zur intrazellulären Lokalisation von PLD1 bekannt. Daher wurden zur genaueren Differenzierung der PLD1-enhaltenden Vesikel Kotransfektionen mit an pDsRed-gekoppelten (rot fluoreszierenden) Markern für die Golgi-Region und die Membranen des ER durchgeführt.

Da PLD 1 nicht in jeder Zelle auch in der Golgi-Region zu finden war, konnte nur partiell eine Kolo-kalisation mit dem Marker für die Golgi-Region, GT (Galactosyltransferase)-DsRed festgestellt werden. GT-DsRed fusioniert mit der Membranankersequenz der humanen Galactosyltransferase, die zur transmedialen Region des Golgi hin ausgerichtet ist (Li *et al.*, 2004). Während im linken Teil der Abb. 16 (unstimulierte Zelle) die rote Fluoreszenz von GT-

DsRed Teile des Golgi-Apparates und das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) markiert, sind die grün fluoreszierenden PLD1-GFP-Vesikel über die gesamte Zelle verteilt. Im rechten Teil dieser Abbildung (stimulierte Zelle) markiert GT-DsRed ebenfalls den Golgi-Apparat und das TGN, während PLD1-GFP sich teilweise an die Plasmamembran verlagert. Einige PLD1-GFP-Vesikel verbleiben allerdings in der Golgi-Region, weshalb hier Kolokalisationen beobachtet werden konnten (gelbe Bereiche).

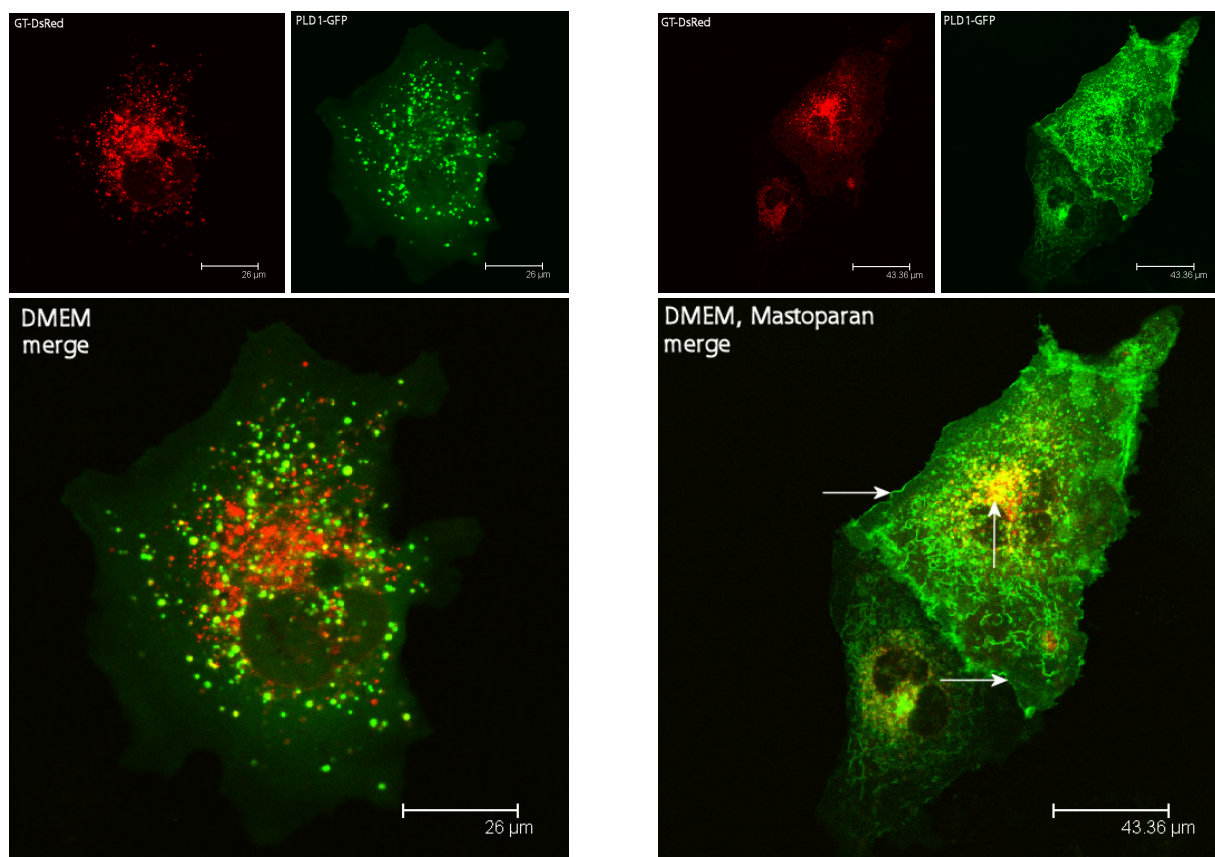


Abb. 16: Lokalisation von PLD1-GFP und GT-DsRed in transient transfizierten COS-1, kultiviert im Grundmedium (DMEM), vor und nach der Stimulation mit Mastoparan. GT-DsRed ist ein Golgi-Marker. Nach der Stimulation mit Mastoparan (25 µM, 1 h) verlagert sich ein Teil der PLD1-GFP-Vesikel an die Plasmamembran (waagerechte Pfeile), während GT-DsRed in der Golgi-Region verbleibt, wo eine partielle Kolokalisation mit PLD1-GFP (gelbe Bereiche, senkrechter Pfeil) vorliegt.

Des Weiteren wurde ein Marker für die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) eingesetzt. ER-DsRed fusioniert mit der ER-Zielsequenz Calreticulin (Li *et al.*, 2004). Auch hier konnten sowohl im unstimulierten als auch im stimulierten Zustand der Zellen partielle Kolokalisationen (gelbe Bereiche) von PLD1-GFP und ER-DsRed beobachtet werden (Abb. 17).

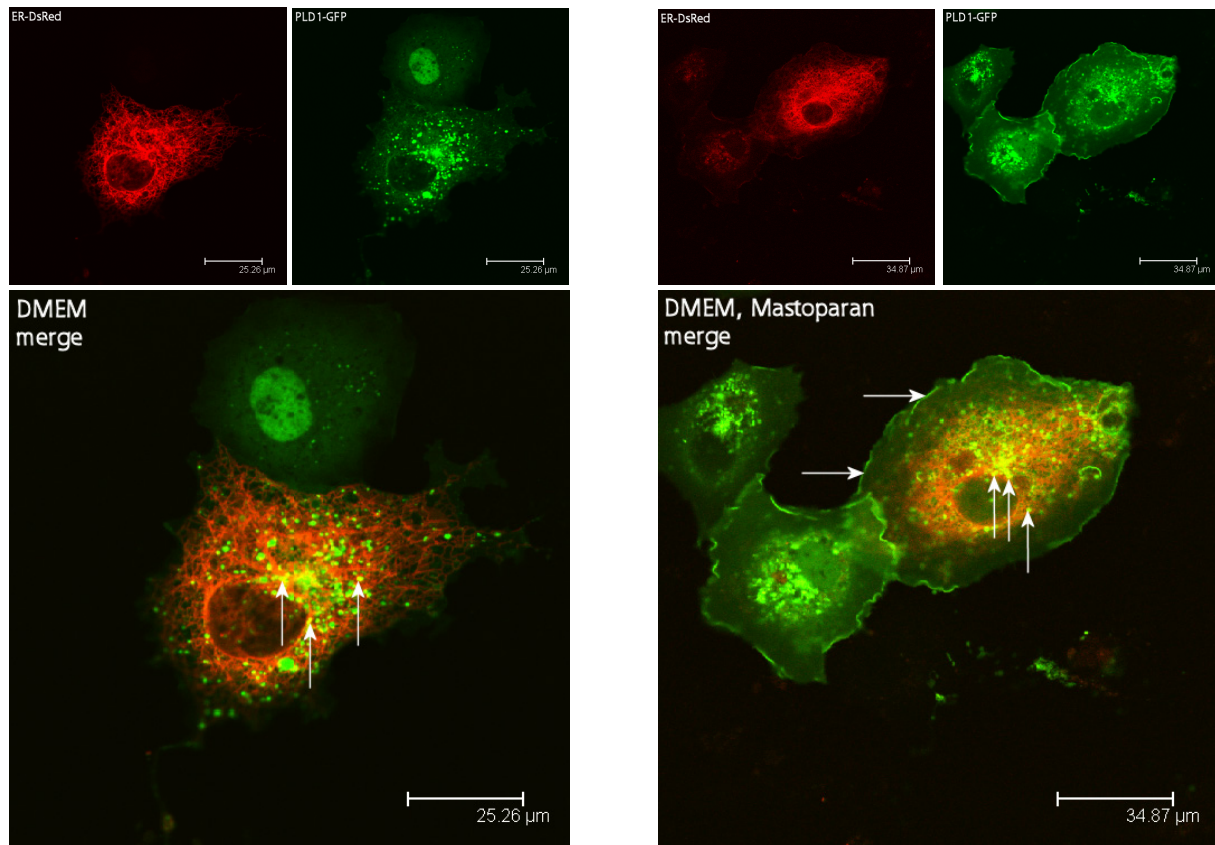


Abb. 17: Lokalisation von PLD1-GFP und ER-DsRed in transient transfizierten COS-1, kultiviert im Grundmedium (DMEM), vor und nach der Stimulation mit Mastoparan. ER-DsRed ist ein Marker für die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Nach der Stimulation mit Mastoparan (25 μ M, 1 h) verlagert sich ein Teil der PLD1-GFP-Vesikel an die Plasmamembran (waagerechte Pfeile). Bei beiden Zellen sind Kolokalisationen beider Marker zu erkennen (gelbe Bereiche, senkrechte Pfeile).

3.2.1.2 Lokalisation von PLD2 bei im Grundmedium kultivierten COS-1

Im Gegensatz zu PLD1 ist PLD2-GFP in unstimulierten COS-1-Zellen hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert. Vereinzelt ist die Fluoreszenz auch in intrazellulären vesikulären Strukturen zu beobachten oder verdichtet sich bei einigen Zellen in der Golgi-Region. Bei Zellen, die im Grundmedium (DMEM) kultiviert wurden, konnte nach der Stimulation mit Mastoparan (25 μ M) keine Veränderung der Lokalisation beobachtet werden (Abb. 18).

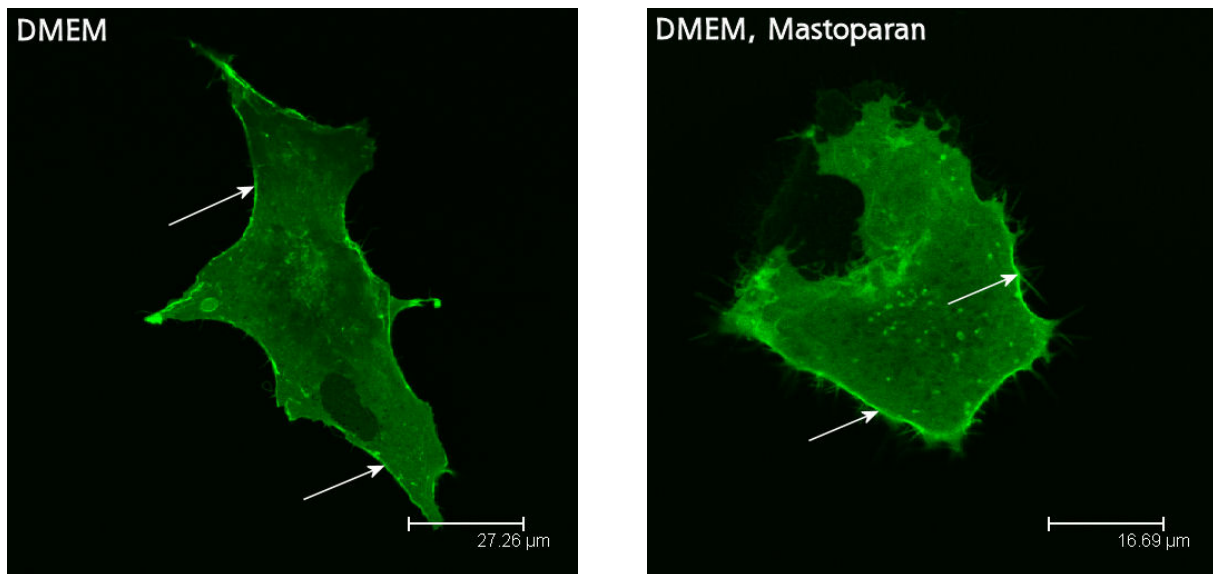


Abb. 18: Lokalisation von PLD2-GFP in transient transfizierten COS-1, kultiviert im Grundmedium (DMEM), vor und nach der Stimulation mit Mastoparan. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion für 1 h mit Mastoparan stimuliert (25 µM) und mikroskopiert. PLD2-GFP ist hauptsächlich im Bereich der Plasmamembran lokalisiert, was sich auch nach der Stimulation der Zellen mit Mastoparan nicht verändert.

3.2.2 Einfluss von Ethanol auf die PLD-Lokalisation und -Expression

Wenn der PLD ein primärer Alkohol (z. B. Ethanol) zur Verfügung steht, macht sie sich diesen als Phosphatidylgruppenakzeptor zunutze (Morris *et al.*, 1997). Phosphatidylcholin wird nicht mehr in Phosphatidsäure, sondern in einen Phosphatidylalkohol (bspw. Phosphatidylethanol) umgewandelt. Da in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der essentiellen Fettsäuren LA und ALA auf die Lokalisation der PLD untersucht werden sollte, diese Fettsäuren aber in Ethanol (Endkonzentration im Medium 0,1 %) gelöst wurden, musste zuerst untersucht werden, ob schon diese geringe Ethanolkonzentration einen Einfluss auf das Enzym ausübt. Dazu wurde eine Ethanol-Kontrolle mitgeführt. Bei dieser Kontrolle wurde dem Grundmedium 0,1 % Ethanol zugesetzt (DMEM-EtOH) und die Zellen nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen transient mit pEGFP-hPLD1 transfiziert. Abb. 19 zeigt Zellen vor und nach der Stimulation mit Mastoparan. Wie auch im DMEM war PLD1 in unstimulierten Zellen vesikulär lokalisiert, während nach der Stimulation mit Mastoparan (25 µM, 1 h) eine Translokation von PLD1-GFP zur Plasmamembran hin stattfand. Diese geringe Ethanolkonzentration hatte somit keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation der PLD.

Des Weiteren wurden die mit pEGFP-hPLD1 transfizierten Zellen biochemisch untersucht. Dazu wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion für 2 h in methioninfreiem Medium inkubiert, um den in den Zellen vorhandenen und für die Proteinbiosynthese essentiellen Methio-

ninpool aufzubrauchen, und danach für 6 h mit [35 S]Methionin markiert. Während dieser 8 h wurden die Zellen steigenden Ethanol-Konzentrationen ausgesetzt. Anschließend wurde ein Teil der Zellen für 1 h mit Mastoparan stimuliert, während der andere Teil unstimuliert blieb. Im Folgenden wurden die PLD-Proteine isoliert, an einen Anti-GFP-Antikörper gebunden und auf einem 6 %-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Die Ergebnisse sind in Abb. 20 dargestellt. Erst bei einer Erhöhung der Ethanol-Endkonzentration auf 3 % waren keine Banden mehr detektierbar.

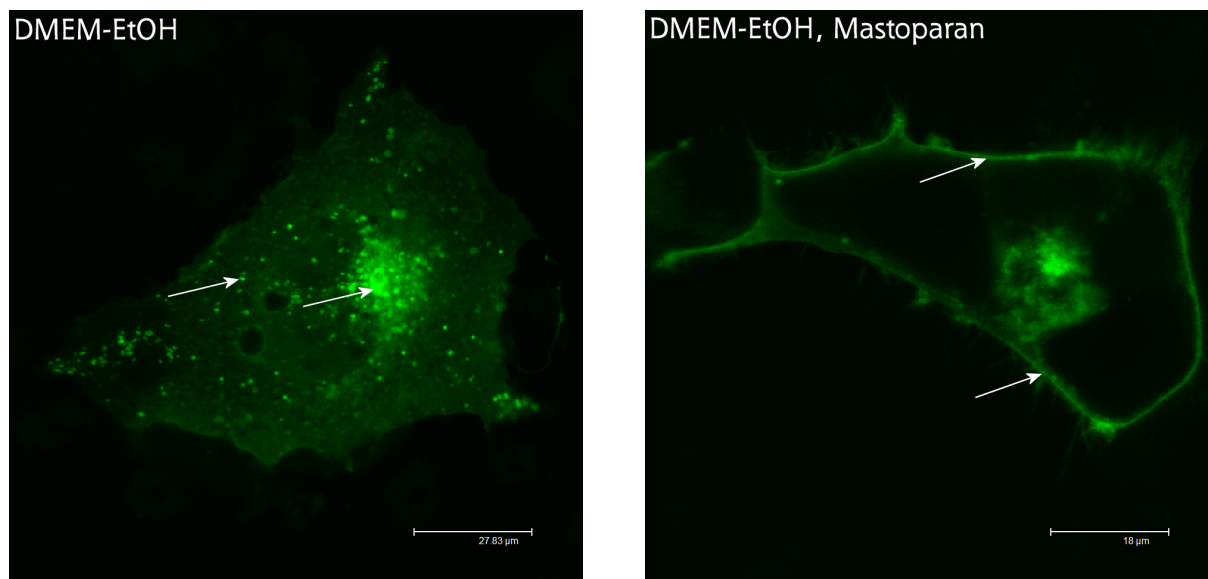


Abb. 19: Lokalisation von PLD1-GFP in transient transfizierten COS-1, kultiviert im DMEM-EtOH, vor und nach der Stimulation mit Mastoparan. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion für 1 h mit Mastoparan stimuliert (25 μ M) und mikroskopiert. Um einen Effekt des Ethanols auszuschließen, wurde dem Kulturmedium 0,1 % Ethanol zugegeben. Nach der Stimulation findet, wie im Grundmedium, eine Translokation zur Plasmamembran statt.

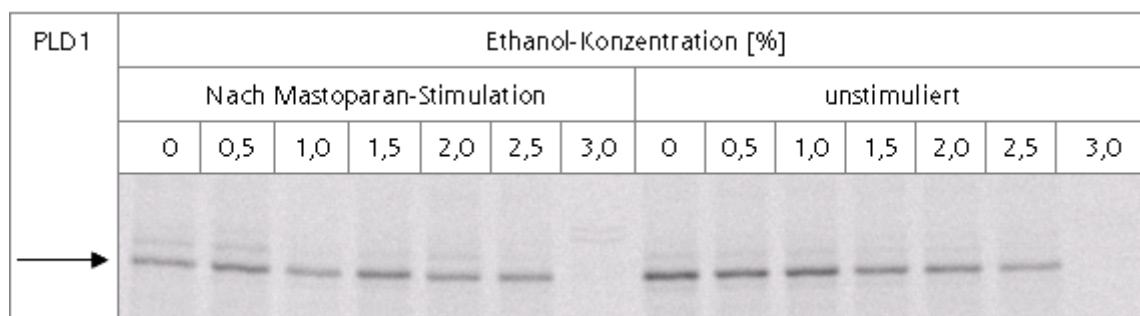


Abb. 20: PLD1-Expression in Abhängigkeit verschiedener Ethanol-Konzentrationen. COS-1-Zellen wurden mit pEGFP-hPLD1 transfiziert, 48 h nach der Transfektion mit [35 S]Methionin markiert und steigenden Ethanol-Konzentrationen ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Stimulation mit Mastoparan (25 μ M, 1 h). Die Detektion der PLD-Banden erfolgte autoradiographisch.

3.2.3 Intrazelluläre Lokalisation der PLD in COS-1-Zellen unter dem Einfluss essentieller Fettsäuren

Um den Einfluss der essentiellen Fettsäuren LA und ALA auf das Verhalten der PLD1 in stimulierten COS-1-Zellen zu untersuchen, wurde das Zellkulturmedium mit LA bzw. ALA supplementiert. Nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen wurden die Zellen mittels DEAE-Dextran mit pEGFP-hPLD1 bzw. pEGFP-mPLD2 transfiziert. Die Auswertung mittels konfokaler Lasermikroskopie erfolgte wieder 48 h nach der Transfektion.

3.2.3.1 Lokalisation von PLD1 in COS-1 unter Linolsäureeinfluss

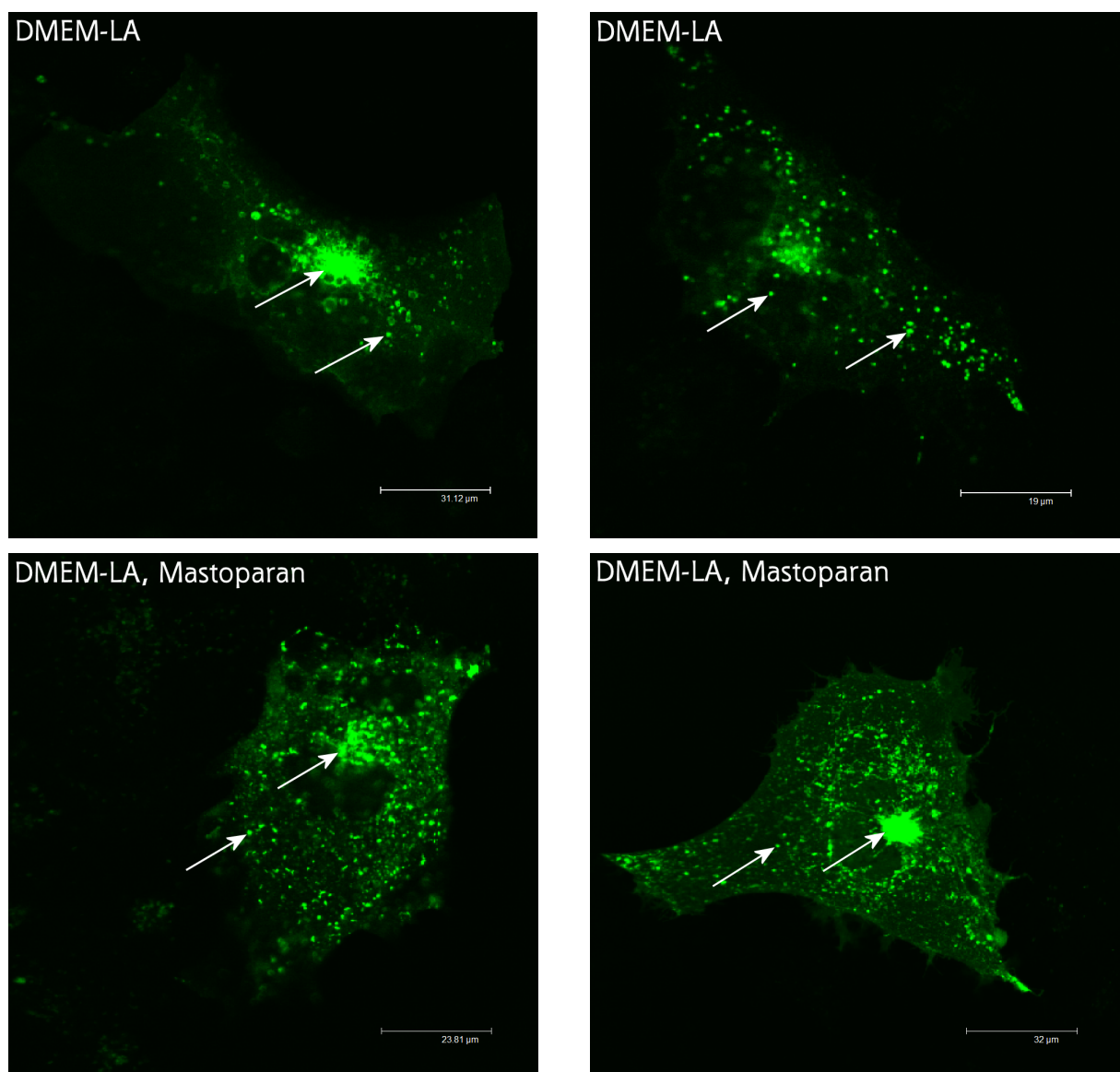


Abb. 21: PLD1-GFP in transient transfizierten und mit Linolsäure supplementierten COS-1-Zellen vor und nach der Stimulation mit Mastoparan. PLD1 bleibt auch nach der Stimulation mit Mastoparan (25 μM , 1 h, untere Bilder) im Golgi-Apparat bzw. in Vesikeln.

Auch bei COS-1-Zellen, deren Medium mit LA supplementiert wurde, befand sich PLD1 ohne die Stimulation durch Mastoparan hauptsächlich in intrazellulären Vesikeln, wobei sich die Fluoreszenz meist in der Golgi-Region verdichtete. Die Wirkung des Mastoparans (25 μ M, 1 h) auf die intrazelluläre Lokalisation der PLD1 wurde durch die Supplementierung mit LA gänzlich ausgeschaltet, denn nach der Stimulation mit Mastoparan war keine Translokation von PLD1-GFP zur Plasmamembran mehr festzustellen. PLD1 blieb in intrazellulären vesikulären Strukturen bzw. in der Golgi-Region lokalisiert (Abb. 21).

3.2.3.2 Lokalisation von PLD2 in COS-1 unter Linolsäureeinfluss

Auch im LA-supplementierten Medium ist PLD2-GFP in unstimulierten COS-1-Zellen hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert. Wieder sind vereinzelt Vesikel subzellulär zu beobachten und bei einigen Zellen verdichtet sich die Fluoreszenz in der Golgi-Region. Die Supplementierung mit LA hat auf PLD2 also keinen merklichen Einfluss. Und wie schon im Grundmedium (DMEM) konnte nach der Stimulation mit Mastoparan keine Veränderung dieser Lokalisation beobachtet werden (Abb. 22).

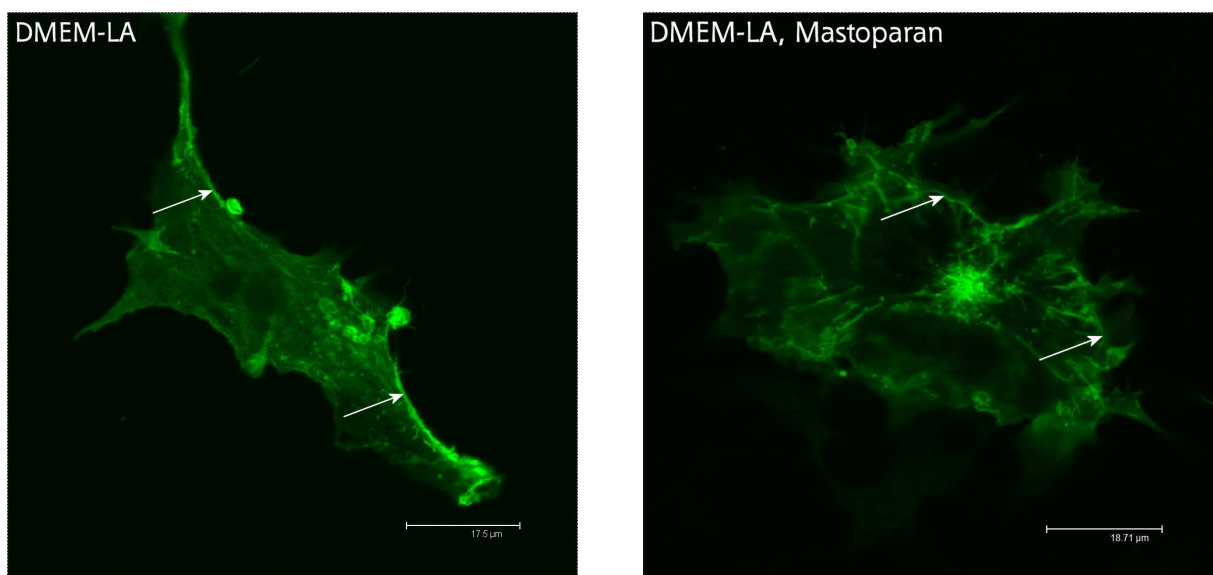


Abb. 22: PLD2-GFP in transient transfizierten und mit Linolsäure supplementierten COS-1-Zellen vor und nach der Stimulation mit Mastoparan. PLD2 bleibt auch nach der Stimulation mit Mastoparan (25 μ M, 1 h) an der Plasmamembran lokalisiert.

3.2.3.3 Lokalisation von PLD1 in COS-1 unter α -Linolensäureeinfluss

Bei COS-1-Zellen, deren Medium mit ALA supplementiert wurde, befand sich PLD1 ebenfalls hauptsächlich in intrazellulären vesikulären Strukturen, wobei sich die Fluoreszenz meist in der Golgi-Region verdichtete. Auch bei in diesem Medium kultivierten Zellen zeigte Mastopa-

ran keine Wirkung, denn nach der Stimulation mit Mastoparan konnte, wie bei mit LA supplementierten Zellen, keine Translokation von PLD1-GFP zur Plasmamembran festgestellt werden. Die Fluoreszenzsignale waren in intrazellulären Vesikeln bzw. in der Golgi-Region zu beobachten (Abb. 23).

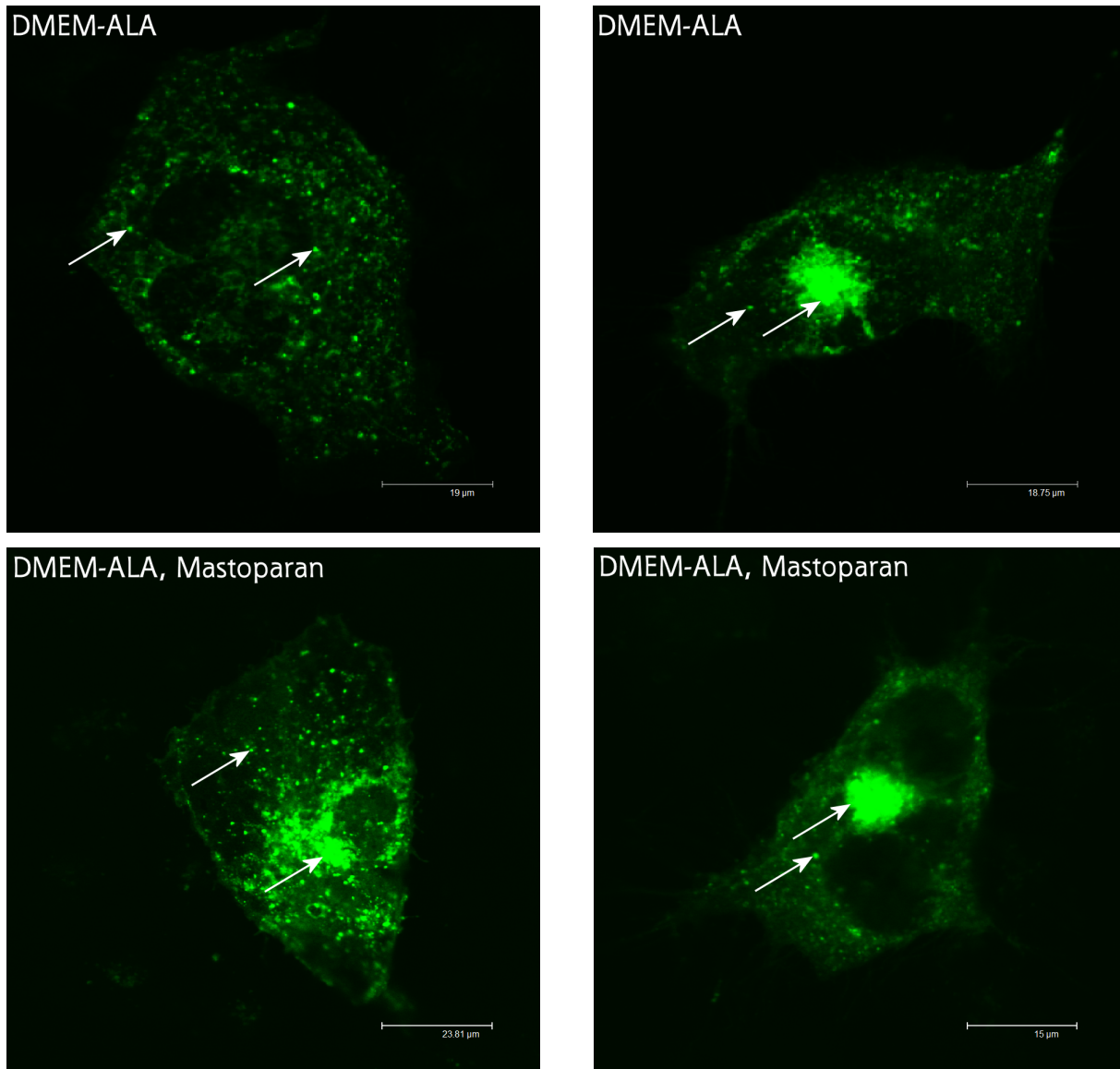


Abb. 23: PLD1-GFP in transient transfizierten und mit α -Linolensäure supplementierten COS-1-Zellen vor und nach der Stimulation mit Mastoparan. PLD1 bleibt auch nach der Stimulation mit Mastoparan (25 μ M, 1 h, untere Bilder) im Golgi-Apparat bzw. in Vesikeln lokalisiert.

3.2.3.4 Lokalisation von PLD2 in COS-1 unter α -Linolensäureeinfluss

Auch in ALA-supplementiertem Medium ist PLD2-GFP in unstimulierten COS-1-Zellen hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert. Vereinzelt sind intrazelluläre Vesikel zu beobachten und bei einigen Zellen verdichtet sich die Fluoreszenz in der Golgi-Region. Wie im Grundmedium (DMEM) und nach LA-Supplementierung (DMEM-LA) konnte nach der Stimulation mit Mastoparan (25 μ M, 1 h) keine Veränderung der Lokalisation beobachtet werden. PLD2 blieb an der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 24).

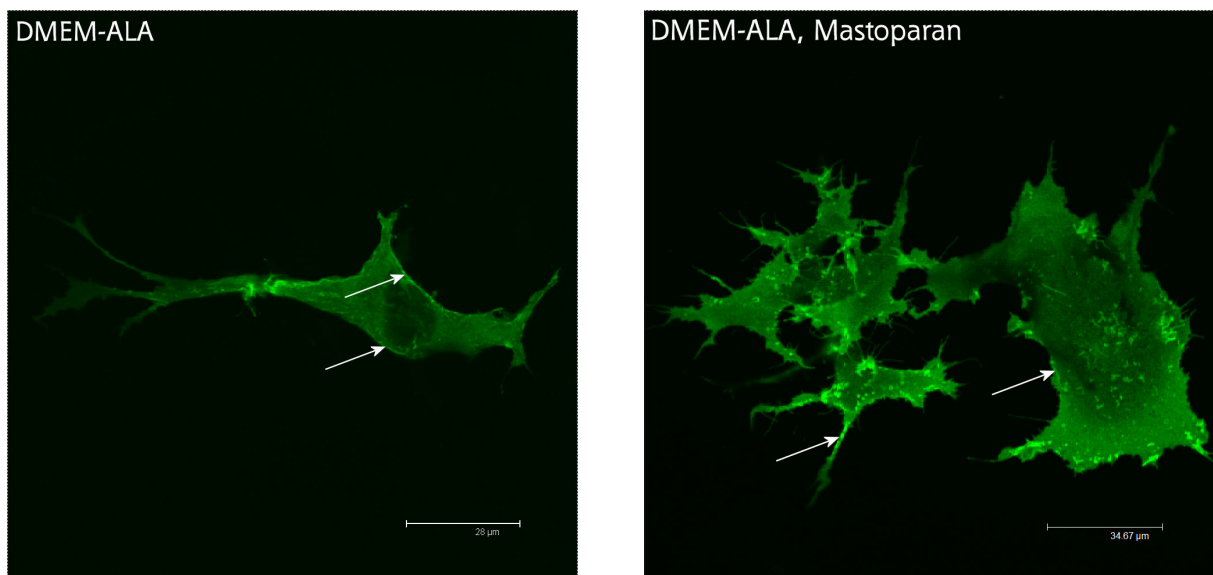


Abb. 24: PLD2-GFP in transient transfizierten und mit α -Linolensäure supplementierten COS-1-Zellen vor und nach der Stimulation mit Mastoparan. PLD2 bleibt auch nach der Stimulation mit Mastoparan (25 μ M, 1 h) an der Plasmamembran lokalisiert.

3.3 *Einfluss der Fettsäuresupplementierung auf die enzymatische Aktivität der PLD*

3.3.1 PLD-Aktivität in COS-1-Zellen

Für Untersuchungen des Einflusses von LA und ALA auf die Aktivität der PLD in COS-1-Zellen wurde die durch die PLD katalysierte Transphosphatidylierung gemessen. Verglichen wurden dabei im Grundmedium kultivierte Zellen mit Zellen, deren Medium mit LA oder ALA supplementiert wurde. Da die supplementierten Fettsäuren in Ethanol (Endkonzentration 0,1 %) gelöst waren, wurden als Vergleichskontrolle Zellen in 0,1 % Ethanol (DMEM-EtOH) mitgeführt. Der PLD-Assay wurde 4 Tage nach der Supplementierung der Zellen mit LA bzw. ALA durchgeführt. Gemessen wurde die PLD-Aktivität einerseits ohne Stimulation, wobei die

Zellen nur mit PBS behandelt wurden, und andererseits nach der Stimulation mit Mastoparan (25 μ M, 1 h).

In allen Medien zeigten die COS-1-Zellen ohne Mastoparanstimulation eine vergleichbar geringe PLD-Aktivität (DMEM 0,83 % [3 H]PBut \pm 0,24; DMEM-LA 1,46 % [3 H]PBut \pm 0,64; DMEM-ALA 1,83 % [3 H]PBut \pm 0,6). Nach der Stimulation mit Mastoparan stieg die PLD-Aktivität in allen Medien signifikant an. Bei im Grundmedium (DMEM) kultivierten COS-1 war ein Anstieg um fast das 9-fache auf 7,22 % [3 H]PBut \pm 1,12 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu verzeichnen. Bei Zellen, die in DMEM-ALA kultiviert wurden, verursachte die Stimulation mit Mastoparan im Vergleich zu den Zellen im Grundmedium eine doppelt so hohe PLD-Aktivität (15,07 % [3 H]PBut \pm 2,53 vs. 7,22 % \pm 1,12). Bei in DMEM-LA kultivierten Zellen erhöhte sich die PLD-Aktivität nach Mastoparanstimulation, verglichen mit dem Grundmedium, um das 2,7-fache (19,83 % [3 H]PBut \pm 4,1 vs. 7,22 % \pm 1,12). Die Zellen in DMEM-EtOH wiesen sowohl im stimulierten (6,95 % \pm 1,11), als auch im unstimulierten Zustand (0,89 % \pm 0,62) etwa die gleiche PLD-Aktivität auf wie die Zellen im Grundmedium (DMEM).

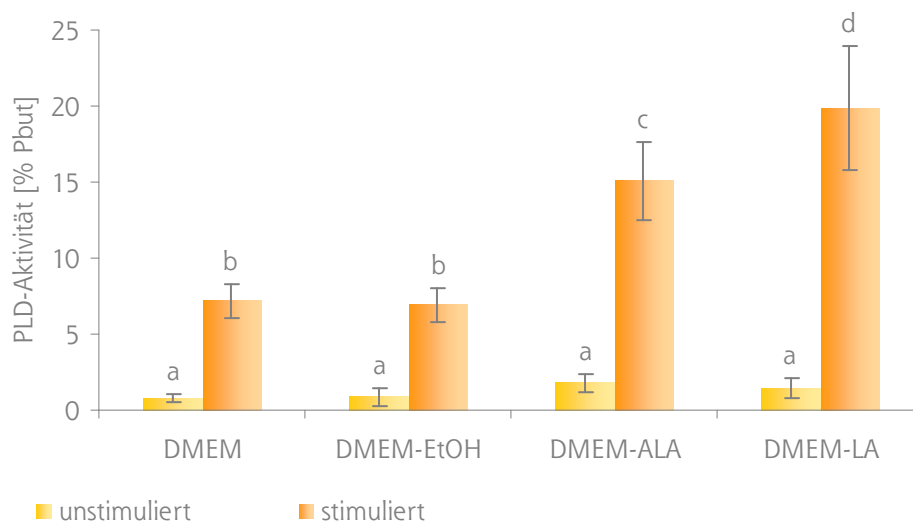


Abb. 25: Einfluss der Fettsäurensupplementierung auf die PLD-Aktivität in stimulierten und unstimulierten COS-1-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte von 6 verschiedenen Versuchsansätzen. Die Zellen wurden mit [3 H]Myristinsäure inkubiert und im Beisein von 0,5 % Butanol mit Mastoparan (25 μ M, 1 h) stimuliert. Als unstimulierte Kontrolle wurde die PLD-Aktivität in Zellen gemessen, die nur mit PBS behandelt wurden. DMEM – Grundmedium, DMEM-EtOH – Ethanolkontrolle, DMEM-ALA – α -linolensäuresupplementiertes Medium, DMEM-LA – linolsäuresupplementiertes Medium. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

3.3.2 PLD-Aktivität in C2-Zellen

Für die Untersuchung des Einflusses von LA und ALA auf die Aktivität der PLD in C2-Zellen wurde ebenfalls die Transphosphatidylierungsreaktion durchgeführt. Verglichen wurden wieder im Grundmedium kultivierte Zellen mit Zellen, deren Medium mit LA oder ALA supplementiert wurde. Auf eine Ethanolkontrolle konnte verzichtet werden, da alle Medien durch den Zusatz von in Ethanol gelöstem Vitamin E bereits 0,1 % Ethanol enthielten. Der PLD-Assay wurde 4 Tage nach der Supplementierung der Zellen mit der jeweiligen essentiellen Fettsäure durchgeführt. Gemessen wurde die PLD-Aktivität einerseits ohne Stimulation, wobei die Zellen nur mit PBS behandelt wurden, und andererseits nach der Stimulation mit Mastoparan.

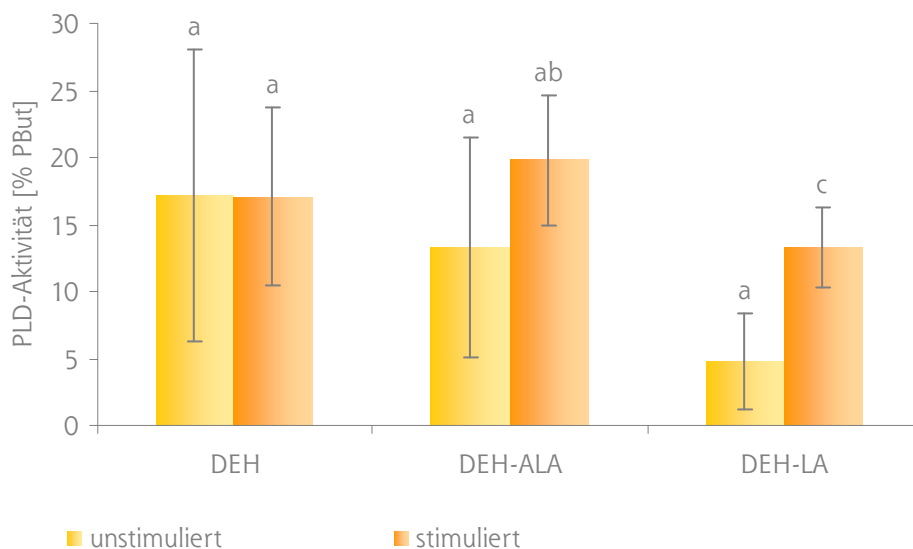


Abb. 26: Einfluss der Fettsäuresupplementierung auf die PLD-Aktivität in stimulierten und unstimulierten C2-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte von 6 verschiedenen Versuchsansätzen. Die Zellen wurden mit [^3H]Myristinsäure inkubiert und im Beisein von 0,5 % Butanol mit Mastoparan (25 μM , 1 h) stimuliert. Als unstimulierte Kontrolle wurde die PLD-Aktivität in Zellen gemessen, die nur mit PBS behandelt wurden. DEH – Grundmedium, DEH-ALA – α -linolensäuresupplementiertes Medium, DEH-LA – linolensäuresupplementiertes Medium. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

Bei den C2-Zellen ist die PLD-Aktivität im Grundmedium (DEH) im Vergleich zu den COS-1-Zellen deutlich höher, wobei kein Unterschied zwischen stimulierten (17,06 % [^3H]PBut \pm 6,62) und unstimulierten (17,14 % [^3H]PBut \pm 10,88) Zellen festgestellt werden kann (Abb. 26). Unstimulierte Zellen im DEH-ALA wiesen im Vergleich zum DEH eine geringere PLD-Aktivität (13,33 % [^3H]PBut \pm 8,21) auf, die nach der Stimulation mit Mastoparan auf 19,78 % [^3H]PBut \pm 4,84 anstieg. Im DEH-LA kultivierte Zellen wiesen im Gegensatz zum

DEH eine um das 3,5-fache verminderte PLD-Aktivität auf (4,78 % [3H]PBut \pm 3,59). Nach der Stimulation mit Mastoparan stieg die PLD-Aktivität auf 13,28 % [3H]PBut \pm 2,99 an. Signifikante Unterschiede gab es aufgrund der hohen Standardabweichungen allerdings nur zwischen stimulierten und unstimulierten C2 im DEH-LA und zwischen stimulierten Zellen in DEH-ALA und DEH-LA.

4 Diskussion

Für eine normale Entwicklung und Funktion von Organismen spielen Fettsäuren eine entscheidende Rolle. Besonders die langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (engl.: *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) sind wichtig für die Gesundheit von höheren Organismen wie Säugern (Leonard *et al.*, 2004). Als integrale Strukturkomponenten bilden die Lipide das Fundament für die strukturelle und funktionelle Integrität von Membranen (Russo *et al.*, 2007). Die Phospholipide der Membranen unterliegen einem kontinuierlichen Umbau, bei dem unter anderem die Phospholipase D (PLD) eine wichtige Rolle spielt. Der PLD, die die Spaltung des Hauptmembranphospholipids Phosphatidylcholin (PC) zu Phosphatidsäure (PA) und Cholin katalysiert (Billah *and* Anthes, 1990; Heller, 1978), werden bedeutende Funktionen beim Aufbau von Zellmembranen, Exozytose, Phagozytose und sekretorischen Transportprozessen zugeschrieben (Cummings *et al.*, 2002). Eine sehr wichtige Rolle spielt die PLD auch bei der Mastzelldegranulation (Cockcroft *et al.*, 2002) und somit bei der Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus den Granula der Mastzellen. Diese Granula bestimmen wesentlich das Krankheitsbild der Caninen Atopischen Dermatitis (CAD). Die PLD1 ist an perinukleären Mastzellgranula lokalisiert und scheint am Transport der Granula zur Zellmembran beteiligt zu sein. Die PLD2 dagegen befindet sich an der Plasmamembran und scheint eine Rolle bei der Freisetzung der Granula zu spielen (Choi *et al.*, 2002). Schon vor einiger Zeit wurde beschrieben, dass Linol- und Arachidonsäure eine stimulierende Wirkung auf die PLD-Aktivität haben (Kim *et al.*, 1999b). So ist das Interesse für Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet sehr stark gewachsen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Fragen über den Effekt der Supplementierung der Kulturmedien von COS-1- und C2-Zellen mit den essentiellen Fettsäuren Linol- und α -Linolensäure auf die Phospholipase D (PLD). Zuerst sollte der Einfluss der zugesetzten Fettsäuren auf die Fettsäurezusammensetzung der Zellen untersucht werden. Das zweite Anliegen war, das Verhalten der PLD in den Zellen zu untersuchen, nachdem diese mit Mastoparan behandelt worden sind. Drittens sollte der Einfluss der zugesetzten Fettsäuren auf die intrazelluläre Lokalisation der Phospholipasen D1 und D2 erforscht werden. Viertens sollte festgestellt werden, welchen Einfluss die Supplementierung des Zellkulturmediums mit Linol- und α -Linolensäure auf die Aktivität der PLD in den Zellen ausübt.

4.1 Fettsäurezusammensetzung der COS-1- und C2-Zellen

Bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde die Bedeutung von Fettsäuren für die Haut in Fütterungsversuchen an Ratten herausgestellt. Die Ratten bekamen eine fettsäurenarme Diät und entwickelten daraufhin eine schuppige Dermatitis. Durch Gabe von Linolensäure wurde diese Dermatitis wieder gebessert. Man ging davon aus, dass durch den Fettsäurenmangel die epidermale Lipidbarriere gestört sei (Burr and Burr, 1929). Ähnliche Beobachtungen wurden später auch an Hunden gemacht (Watson, 1998). Die essentiellen Fettsäuren (engl.: *essential fatty acids*, EFA) Linol- (LA) und α -Linolensäure (ALA) und deren Metabolite spielen dabei eine große Rolle. Besonders deutlich wird dies, wenn die Synthese dieser Metabolite gestört ist, wie es für die Atopische Dermatitis bei Mensch und Hund diskutiert wird. Wahrscheinlich wird ein geringerer Teil der diätetischen EFAs in deren Metabolite umgewandelt und so ein verminderter Einbau in die Membranphospholipide verursacht (Horrobin, 2000). So wurden bei Atopikern niedrigere Konzentrationen an LA-Metaboliten in Plasma (Manku *et al.*, 1982; Manku *et al.*, 1984), Erythrozyten (Oliwiecki *et al.*, 1991) und epidermalen Phospholipiden (Schafer and Kragballe, 1991) gemessen. Es wird davon ausgegangen, dass bei der Atopischen Dermatitis ein $\Delta 6$ -Desaturasemangel und eine unzureichende $\Delta 5$ -Desaturaseaktivität besteht (Campbell, 1993) und die Umwandlung von LA und ALA in ihre längerkettigen und mehrfach ungesättigten Metabolite nicht bzw. nicht ausreichend vollzogen wird. So wurde auch bei atopischen im Vergleich zu gesunden Hunden eine geringere Metabolisierung der Dihomo- γ -Linolensäure (DGLA, C20:3n6) zu Arachidonsäure (AA, C20:5n6) nachgewiesen. Untersuchungen des Fettsäurenmusters von Erythrozyten gesunder und an Atopie erkrankter Hunde lassen eine verminderte Aktivität von $\Delta 5$ - und $\Delta 6$ -Desaturase bei den Atopikern vermuten (Fuhrmann *et al.*, 2006). Eine erfolgreiche Therapie der Atopischen Dermatitis durch die diätetische Gabe von n3- und n6-Fettsäuren könnte somit auf den Ausgleich der gestörten körpereigenen Fettsäuresynthese zurückzuführen sein.

Die diätetischen Fettsäuren beeinflussen das zelluläre Fettsäurenmuster. Sie werden direkt oder nach ihrer Metabolisierung in die zellulären Membranen eingebaut und beeinflussen so die Eigenschaften der Membranen (Grammatikos *et al.*, 1994a). Die vermehrte Einlagerung von gesättigten Fettsäuren und Cholesterol in die Membranphospholipide macht die Membranen unflexibel. Eine vermehrte Einlagerung ungesättigter Fettsäuren erhöht dagegen ihre Fluidität, die Anzahl der Rezeptoren und deren Affinität zu den zugehörigen Hormonen und Wachstumsfaktoren (Das, 2006a). Auf diese Weise wirken die Nahrungsfettsäuren auch auf immunologisch wirksame Zellen. Bei Mastzellen beispielsweise beeinflusst die Veränderung der Membranlipide die Exozytose vorgefertigter Mediatoren (z. B. Histamin) und die Freiset-

zung neu synthetisierter Lipidmediatoren (Gueck *et al.*, 2003; Gueck *et al.*, 2004), die aus den Membranphospholipiden gebildet wurden (Seidel *et al.*, 2005). Bei der Degranulation und der Aktivierung von Mastzellen spielen auch *Lipid Rafts* eine entscheidende Rolle, da die IgE-vermittelte Mastzellaktivierung von der Einlagerung des FcεRI in diese Mikrodomänen abhängt (Field *et al.*, 1997). Eine veränderte Fettsäurezusammensetzung der Zellmembran hat Auswirkungen auf die *Lipid Rafts* und somit auch auf die Einlagerung des FcεRI und die Mastzellaktivierung. Es wird diskutiert, dass PUFA Sphingolipide aus den *Lipid Rafts* verdrängen und damit die Assoziation von Proteinen mit den Mikrodomänen erschweren (Fan *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2004). Weiterhin sind insbesondere die n3-PUFA natürliche Liganden für Kernfaktoren wie Peroxisom-Proliferator aktivierte Rezeptoren (PPAR) (Jump *et al.*, 1999) und üben damit eine direkte Wirkung auf die Genexpression aus.

Schon vor einiger Zeit wurde der Einfluss der essentiellen Fettsäuren auf Mastzell-Mediator-Aktivitäten, –Produktion und –Freisetzung an der caninen Mastozytomzelllinie C2 untersucht (Gueck *et al.*, 2003). Dabei wurde gezeigt, dass die C2 exogen angebotene Linolsäure (LA, C18:2n6) und α-Linolensäure (ALA, C18:3n3) einbauen und in ihre längerkettigen n6- und n3-Metabolite umwandeln. Zudem ist sicher, dass die Supplementierung des Zellkulturmediums mit LA (C18:2n6) oder ALA (C18:3n3) einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Zellmembranen und die Eigenschaften der Zellen ausübt. Denn nach der Supplementierung mit LA (C18:2n6) wurden eine erhöhte Tryptase-Aktivität und eine vermehrte Histaminfreisetzung gemessen, wogegen nach der Supplementierung mit ALA (C18:3n3) Tryptase-Aktivität, Histaminfreisetzung und Prostaglandin E2 (PGE2)–Produktion erniedrigt waren. Auch andere Arbeitsgruppen erhielten ähnliche Ergebnisse an Maus- und Ratten-Mastzelllinien nach der Behandlung mit n3-Fettsäuren (Ishihara *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1994). Diese Ergebnisse könnten die Wirkung der mit n3-Fettsäuren angereicherten Diäten in klinischen Studien zur Atopischen Dermatitis erklären (Gueck *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden den Zellkulturmedien die zu untersuchenden Fettsäuren in einer Endkonzentration von 14 µM (C2-Zellen) bzw. 20 µM (COS-1-Zellen) zugesetzt. Im Rahmen vorangegangener Studien an den C2 wurde diese Konzentration ebenfalls verwendet (Seidel *et al.*, 2005). Diese Konzentrationen der supplementierten Fettsäuren sind mit Angaben aus früheren Arbeiten vergleichbar. So wurden einer Hepatomzelllinie verschiedene Fettsäuren in einer Konzentration von 50 µM zugegeben (Gonzalez *et al.*, 2000). Andere Autoren untersuchten den Effekt von ALA auf den n3- und n6-Fettsäurenmetabolismus und den Histamingehalt von RBL-2H3-Zellen (Kawasaki *et al.*, 1994). Bei einer Supplementierung des Kulturmediums mit 34 – 103 µM ALA wuchsen die Zellen gut, während das Wachstum bei einer Zugabe von 137 µM deutlich gehemmt wurde.

4.1.1 Änderung des Fettsäurenmusters der Zellen durch die Supplementierung mit ALA und LA

Das Fettsäurenmuster von Zellen *in vivo* reflektiert die aktuell von einem Organismus über die Nahrung aufgenommenen essentiellen Fettsäuren (Grammatikos *et al.*, 1994a). In Kultur gehaltene Zellen zeigen ähnlich denen *in vivo* eine Änderung der Fettsäurezusammensetzung, wenn ihnen exogen Fettsäuren angeboten werden (Spector *and* Yorek, 1985). Das rührt von der Tatsache, dass die Zellen vornehmlich die exogen angebotenen Fettsäuren verwerten. Wenn ein ausreichendes Angebot an Fettsäuren vorhanden ist, wird die *de novo*-Synthese unterdrückt (Spector *et al.*, 1980).

COS-1- und C2-Zellen benötigen für ihr Wachstum den Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS), da sie in serumfreiem Medium bereits nach kurzer Zeit absterben. Bei COS-1-Zellen wurde dem Medium 10 % FKS zugesetzt, bei den C2 war ein FKS-Anteil von 5 % für ein gutes Wachstum ausreichend. Für die Untersuchung der Veränderungen der zellulären Fettsäurezusammensetzung durch die Supplementierung mit den essentiellen Fettsäuren LA (C18:2n6) und ALA (C18:3n3) wurde das Fettsäurenmuster von COS-1- und C2-Zellen gaschromatographisch bestimmt.

4.1.1.1 Einbau und Metabolisierung der supplementierten Fettsäuren in COS-1-Zellen

Die dem Grundmedium zugesetzten Fettsäuren LA (C18:2n6) und ALA (C18:3n3) spiegelten sich nach der 4-tägigen Kultivierung deutlich im Fettsäurenmuster der COS-1 wider. So war ein erhöhter Einbau der supplementierten Fettsäure im Vergleich zu den im Grundmedium (DMEM) kultivierten Zellen zu verzeichnen. Die mit ALA (C18:3n3) supplementierten Zellen (DMEM-ALA) erreichten eine 4,1-fache Steigerung ihres prozentualen Gehaltes an n3-Fettsäuren. Die Supplementierung mit LA (C18:2n6, DMEM-LA) resultierte in einer 1,9-fachen Erhöhung des Gesamt-n6-Fettsäuregehaltes. In einer Reihe von Studien an unterschiedlichen Zellkultursystemen konnte nachgewiesen werden, dass auch Zellkulturen die ihnen exogen angebotenen essentiellen Fettsäuren metabolisieren können (Grammatikos *et al.*, 1994b; Rosenthal, 1987; Spector *et al.*, 1980). Für die Umsetzung von LA (C18:2n6) und ALA (C18:3n3) zu den C20-PUFA Arachidonsäure (AA, C20:4n6) und Eicosapentaensäure (EPA, C20:5n3) ist die Metabolisierung durch die $\Delta 6$ - und $\Delta 5$ -Desaturase notwendig. Permanente Zelllinien sind üblicherweise in der Lage, exogen zugeführte LA (C18:2n6) und ALA (C18:3n3) zu elongieren und die meisten weisen auch eine $\Delta 5$ -Desaturaseaktivität auf. Die $\Delta 6$ -Desaturase stellt somit den limitierenden Schritt bei der Bildung von AA (C20:4n6) und

EPA (C20:5n3) dar (Grammatikos *et al.*, 1994b). Längere Fettsäuren mit mehr Doppelbindungen als AA (C20:4n6) oder EPA (C20:5n3) werden allerdings kaum synthetisiert, da die meisten Zellkulturen eine Δ 4-Desaturasedefizienz aufweisen (Grammatikos *et al.*, 1994a).

Betrachtet man nun die Anteile der einzelnen Fettsäuren der jeweiligen Fettsäurenfamilie (3.1.1) fällt auf, dass bei den COS-1 nicht die erwarteten Stoffwechselprodukte des n3- und n6-Metabolismus (1.3.1.1) erhöht waren, sondern Eicosatriensäure (ETrA, C20:3n3) und Eicosadiensäure (EDA, C20:2n6). Das lässt vermuten, dass die COS-1-Zellen ihre Fettsäuren auf einem alternativen Weg metabolisieren (Abb. 27).

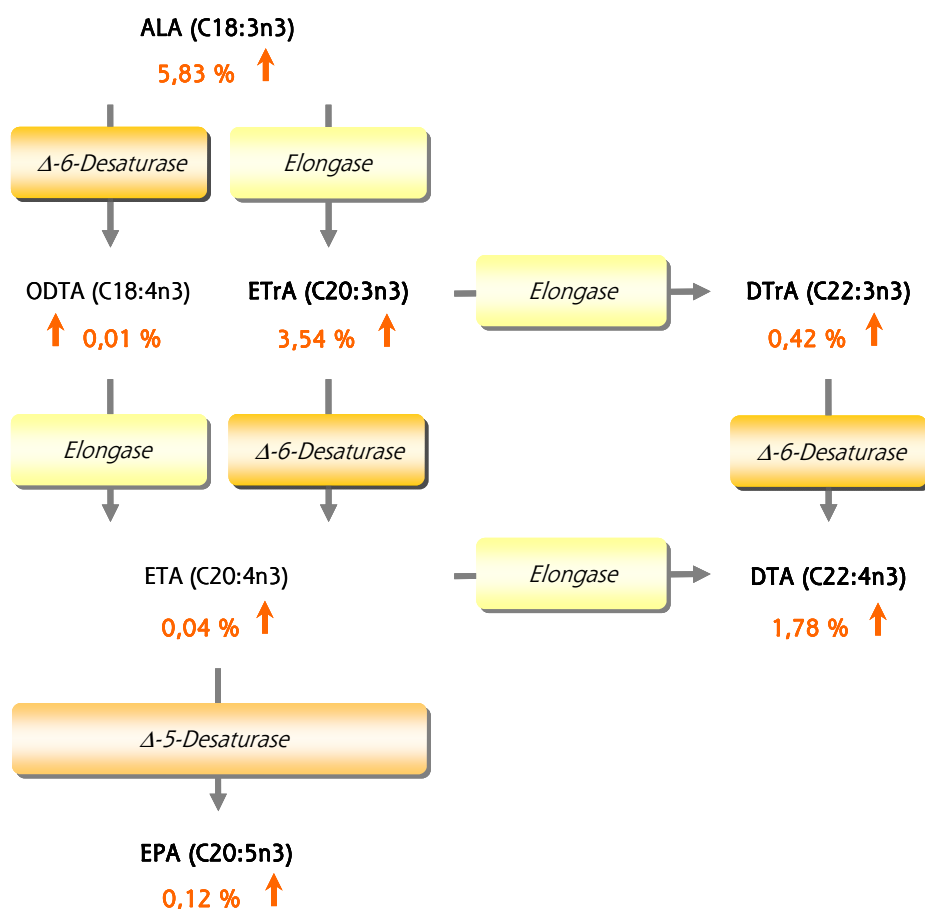


Abb. 27: Möglicher Metabolismus der n3-Fettsäuren in den COS-1-Zellen. α -Linolensäure (ALA) wird durch eine Elongase zu Eicosatriensäure (ETrA) umgewandelt, die wiederum durch eine Elongase zu Docosatriensäure (DTrA) metabolisiert werden könnte. Ein geringer Teil könnte durch die Δ 6-Desaturase in die Octadecatetraensäure (ODTA), Eicosatetraensäure (ETA) oder Docosatetraensäure (DTA) umgewandelt werden. Die orangen Zahlen und Pfeile kennzeichnen den prozentualen Anstieg der einzelnen Fettsäuren. ALA – α -Linolensäure, ODTA – Octadecatetraensäure, ETrA – Eicosatriensäure, ETA – Eicosatetraensäure, EPA – Eicosapentaensäure, DTrA – Docosatriensäure, DTA – Docosatetraensäure, DPA – Docosapentaensäure.

Die längerkettigen und höher ungesättigten Fettsäuren werden in Säugetierzellen durch Elongation und Desaturierung der essentiellen Fettsäuren LA und ALA gebildet. Bei Säugerzellen wird ALA (C18:3n3) durch die $\Delta 6$ -Desaturase in Octadecatetraensäure (ODTA, C18:4n3) umgewandelt. Eine Zunahme der ODTA konnte bei den COS-1 jedoch nicht gemessen werden. Ein signifikanter Anstieg wurde hingegen bei der Eicosatriensäure (ETra, C20:3n3, Anstieg: 45,5-fach) ermittelt (Abb. 27). Dies legt die Vermutung nahe, dass die COS-1 einen anderen Stoffwechselweg einschlagen, indem ALA (C18:3n3) über die Wirkung einer Elongase zu ETra (C20:3n3) metabolisiert wird. Anscheinend weisen die COS-1 nur eine äußerst geringe Desaturaseaktivität auf und beschreiten alternativ den Weg über die Elongase. Für eine geringe Desaturaseaktivität könnte ebenfalls die leichte, aber dennoch signifikante, Erhöhung der Eicosapentaensäure (EPA, C20:5n3) sprechen, die über Elongation der ODTA (C18:4n3) zu Eicosatetraensäure (ETA, C20:4n3) und deren Desaturierung gebildet werden könnte. Eine zweimalige Desaturierung der ETra (C20:4n3) ist auszuschließen, da diese über die $\Delta 8$ - und die $\Delta 5$ -Desaturase erfolgen müsste. Die $\Delta 8$ -Desaturase ist allerdings nur für niedere Eukaryoten beschrieben worden. Diese Organismen können den konventionellen $\Delta 6$ -Desaturase-Elongase-Schritt umgehen und durch einen alternativen Weg über die $\Delta 8$ -Desaturase ersetzen (Pereira *et al.*, 2003; Wallis and Browse, 1999). Da es sich bei den COS-1 aber um eine Zelllinie aus höheren Eukaryoten handelt, ist diese Möglichkeit nicht in Erwägung zu ziehen. Die ETra (C20:3n3) könnte auch über die Wirkung einer weiteren Elongase zu Docosatriensäure (DTrA, C22:3n3) verlängert werden. Im Gegensatz zu den unsupplementierten Zellen wurde DTrA (C22:3n3) in den ALA-supplementierten Zellen gemessen. Auch der Anteil an Docosatetraensäure (DTA, C22:4n3) war in den unsupplementierten Zellen nicht messbar und stieg nach ALA-Supplementierung auf 1,78 %. DTA (C22:4n3) könnte entweder durch die Aktivität der $\Delta 6$ -Desaturase aus DTrA (C22:3n3) oder durch Elongation aus ETA (C20:4n3) entstanden sein. Auch dies ist ein Indiz für eine geringe $\Delta 6$ -Desaturaseaktivität der COS-1.

Bei der n6-Familie verhält es sich ähnlich. Auch hier konnte nur ein geringer, allerdings signifikanter, Anstieg der γ -Linolensäure (GLA, C18:3n6, Anstieg: 2,3-fach) gemessen werden, die durch Desaturierung der LA (C18:2n6) gebildet wird. Eine stärkere Erhöhung konnte jedoch bei der Eicosadiensäure (EDA, C20:2n6, Anstieg: 4,3-fach) gemessen werden, was vermuten lässt, dass sie durch Elongation der LA (C18:2n6) entstanden ist. Schon in den späten 1980er Jahren war bekannt, dass Zellen, die LA (C18:2n6) nicht desaturieren können, diese Fettsäure durch Elongation zu EDA (C20:2n6) umwandeln. Dies wurde an Leberzellen untersucht, deren Desaturierung durch Norflurazon (ein Herbizid aus der Gruppe der Pyridazin-Derivate) inhibiert wurde. Die Zellen wiesen eine aktive Elongation der Fettsäuren auf. Zwar verläuft der Hauptweg des Fettsäurenmetabolismus über alternierende Desaturie-

rungen und Elongationen. Die Elongation kann aber auch ohne eine vorherige Desaturierung stattfinden und wird in diesem Fall als *Dead end*-Elongation bezeichnet, weil ihre Produkte von denen des eigentlichen Fettsäurenmetabolismus abweichen (Rosenthal, 1987).

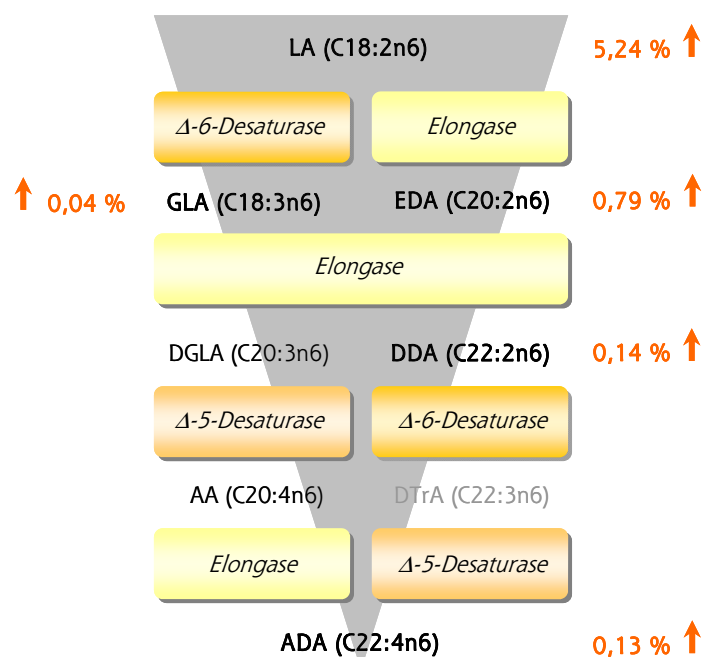


Abb. 28: Möglicher Metabolismus der n6-Fettsäuren in den COS-1-Zellen. Die COS-1 haben wahrscheinlich nur eine sehr geringe Desaturaseaktivität und scheinen die Fettsäuren daher vorwiegend über Elongasen zu metabolisieren. Die orangen Zahlen und Pfeile kennzeichnen den prozentualen Anstieg der einzelnen Fettsäuren. LA – Linolsäure, GLA – γ -Linolensäure, EDA – Eicosadiensäure, DGLA – Dihomo- γ -Linolensäure, DDA – Docosadiensäure, AA – Arachidonsäure, DTA – Docosatetraensäure, ADA – Adrensäure.

Auch der Anteil an Docosadiensäure (DDA, C22:2n6, Anstieg: 2-fach) war bei den COS-1 signifikant erhöht. Diese Fettsäure könnte durch Elongation aus der EDA (C20:2n6) gebildet worden sein. Dass auch eine Erhöhung der Adrensäure (C22:4n6, Anstieg: 1,3-fach) gemessen wurde, verdeutlicht die Vermutung, dass die Zellen eine geringe Desaturaseaktivität aufweisen. Adrensäure (C22:4n6) könnte durch zweimalige Desaturierung der DDA (C22:2n6) entstanden sein. Wahrscheinlich ist aber auch, dass die Adrensäure durch Elongation aus AA (C20:4n6) entstanden ist, die dem Zellmedium mit dem FKS zugeführt wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der primäre Effekt einer Fettsäurensupplementierung eine Modifizierung der zellulären Fettsäurezusammensetzung darstellt. Bei den COS-1-Zellen erhöhte sich dabei die Gesamtsumme an n3-Fettsäuren nach der Supplementierung mit ALA (C18:3n3) auf 14,9 % und die Zufuhr der n6-Fettsäure LA (C18:2n6) führte zu einer Zunahme der Gesamt-n6-Summe auf 13,57 %. Unabhängig von der Art der supplementierten FS ändert sich demnach der prozentuale Gehalt an PUFA im Gesamtfettpool in ähnlicher

Weise. Im Hinblick auf die Canine Atopische Dermatitis (CAD) kann bei dieser Zelllinie keine Aussage getroffen werden, da man bei den vorliegenden Ergebnissen davon ausgehen muss, dass der Stoffwechsel der COS-1 nicht dem einer epidermalen Mastzelle entspricht.

4.1.1.2 Einbau und Metabolisierung der supplementierten Fettsäuren in C2-Zellen

Auch bei den C2 spiegelt sich die Supplementierung des Kulturmediums mit LA (C18:2n6) und ALA (C18:3n3) nach der 4-tägigen Kultivierung in der Fettsäurezusammensetzung der Zellen wider. Die Supplementierung des Kulturmediums mit LA (C18:2n6, DEH-LA) führte zu einer 4,5-fachen Erhöhung des Gesamt-n6-Fettsäuregehaltes. Demgegenüber führte die Anreicherung des Mediums mit ALA (C18:3n3, DEH-ALA) zu einer 9,6-fachen Steigerung des Gehaltes an n3-PUFA. Auch in anderen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die n3-PUFA gegenüber den n6-PUFA bevorzugt eingebaut und umgesetzt werden (Das, 2006a; Seidel *et al.*, 2005).

Die mit LA angereicherten Zellen wiesen einen 4,5-fach erhöhten Gehalt an GLA (C18:3n6) auf. Dies ist auf die Aktivität der $\Delta 6$ -Desaturase zurückzuführen. Die $\Delta 6$ -Desaturase katalysiert ebenfalls die Umwandlung der ALA (C18:3n3) in die Octadecatetraensäure (ODTA, C18:4n3), deren Gehalt in den C2-Zellen nicht messbar war. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass die Verlängerungsprodukte von LA (C18:2n6) und ALA (C18:3n3) sehr schnell durch die Elongase weiter umgesetzt werden, wodurch sie gerade noch als Zwischenprodukte bei LA- oder ALA-supplementierten Zellen erkannt werden können (Rosenthal, 1987). Beide Fettsäuren werden anschließend durch eine Elongase in ihre längerkettigen Metabolite Dihomo- γ -Linolensäure (DGLA, C20:3n6) und Eicosatetraensäure (ETA, C20:4n3) umgewandelt. Der DGLA (C20:3n6)-Gehalt stieg nach LA-Supplementierung im Vergleich zum Grundmedium (0,66 %) auf 6,08 % an, der ETA (C20:4n3)-Gehalt auf 4,49 %. In der Literatur wird die Bevorzugung von ALA (C18:3n3) vor LA (C18:2n3) als Substrat der $\Delta 6$ -Desaturase beschrieben (Rosenthal *and* Whitehurst, 1983; Sardesai, 1992b). Im Fettsäurenmetabolismus katalysiert dasselbe Enzym die vergleichbaren Schritte bei den Stoffwechselwegen der n7-, n9-, n6- und n3-Fettsäuren, wobei die Fettsäuren um die Enzymsysteme konkurrieren (Sardesai, 1992a). Die $\Delta 6$ -Desaturase ist dabei das wichtigste Enzym. Sie scheint die größte Affinität zu dem Substrat mit den meisten Doppelbindungen zu haben. Daher weist α -Linolensäure mit drei Doppelbindungen die höchste Desaturierungsrate auf, gefolgt von Linol- und Ölsäure (Sprecher *et al.*, 1987). Demnach müsste man also eine stärkere Erhöhung der ETA (C20:4n3) gegenüber der DGLA (C20:3n6) erwarten, was nicht der Fall ist, wenn man nur die Differenz aus dem Gehalt der jeweiligen Fettsäure im Grundmedium und

im supplementierten Medium betrachtet. Wenn man sich jedoch das Verhältnis der Fettsäuren zwischen Grundmedium und supplementiertem Medium (also den Steigerungsfaktor) anschaut, kann diese Aussage bestätigt werden. Die ETA (C20:4n3) nimmt demnach von 0,11 % im DEH auf 4,49 % im DEH-ALA zu, was einen Anstieg um etwa das 40-fache bedeutet. Der DGLA (C20:3n6)-Gehalt ist dagegen mit 0,66 % im DEH schon höher als der ETA (C20:4n3)-Gehalt, und steigt im DEH-LA auf 6,08 %, was einen etwa 9-fachen Anstieg darstellt. Der somit stärkere Anstieg des ETA (C20:4n3)-Gehaltes in den C2-Zellen könnte damit erklärt werden, dass durch die $\Delta 6$ -Desaturase mehr ALA (C18:3n3) umgesetzt wird, deren Produkt ODTA (C18:4n3) allerdings sehr schnell durch die Elongase weiter verstoffwechselt wird, weshalb kein Anstieg dieser Fettsäure messbar war. Bisher sind sechs Elongasen beschrieben worden, von denen die Elongase 5 (ELOVL5) für die Verlängerung der Fettsäuren mit 18 – 22 C-Atomen verantwortlich ist (Jakobsson *et al.*, 2006). Untersuchungen zeigten, dass ELOVL5 die ODTA (C18:4n3) als Substrat bevorzugt (Inagaki *et al.*, 2002). Der starke Anstieg der ETA (C20:4n3) in den C2 könnte also einerseits auf die Bevorzugung der ALA (C18:3n3) durch die $\Delta 6$ -Desaturase und andererseits auf die Substratpräferenz der ELOVL5 für die ODTA (C18:4n3) zurückzuführen sein.

DGLA (C20:3n6) und ETA (C20:4n3) werden anschließend durch die $\Delta 5$ -Desaturase in Arachidonsäure (AA, C20:4n6) und Eicosapentaensäure (EPA, C20:5n3) umgewandelt. Der Gehalt an AA (C20:4n6) stieg um das 1,4-fache, während der EPA (C20:5n3)-Gehalt um das 5,2-fache erhöht war. Ähnliche Ergebnisse wurden früher schon bei den C2-Zellen erhalten. Die Zellen wurden bei dieser Untersuchung mit GLA (C18:3n6) supplementiert. Anschließend konnten erhöhte Gehalte an GLA und ihrem Elongationsprodukt DGLA (C20:3n6) gemessen werden, während AA (C20:4n6) weitgehend unverändert blieb. Deswegen wird vermutet, dass die C2-Zellen eine unzureichende $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität besitzen (Gueck *et al.*, 2004). Vergleichbares beschrieben auch andere Autoren bei Untersuchungen an humanen Neutrophilen nach einer mit GLA (C28:3n3) angereicherten Diät (Johnson *et al.*, 1997). Generell wird für die Zellen der Haut das Fehlen der $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität beschrieben (Olivry *et al.*, 2001). Da es sich bei den C2-Zellen um eine Mastozytomzelllinie aus der Haut von Hunden handelt, wird die Vermutung eines bestehenden $\Delta 5$ -Desaturase-Defizites durch diese Arbeiten bekräftigt. Die Supplementierung der C2 mit Docosahexaensäure (DHA, C22:6n3) dagegen führte zu einer Erhöhung des Gehaltes an DHA und EPA (C20:5n3), was eine Retrokonversion von DHA zu EPA vermuten lässt (Gueck *et al.*, 2004). Ähnliche Vorgänge wurden auch an dermalen Fibroblasten gezeigt (Rosenthal *et al.*, 1991).

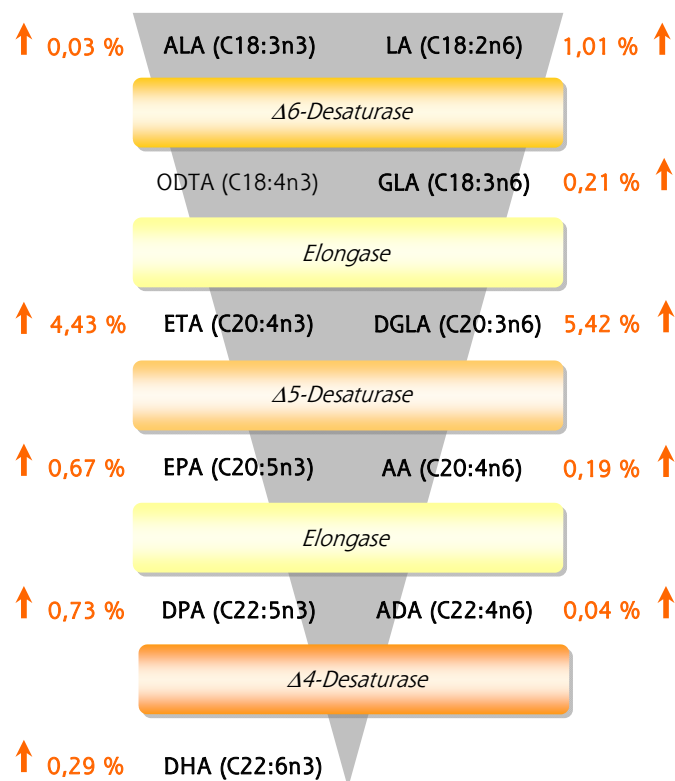


Abb. 29: Metabolismus der n3- und n6-Fettsäuren in den C2-Zellen. Die C2 metabolisieren die ihnen angebotenen essentiellen Fettsäuren auf dem Hauptweg des Fettsäurenmetabolismus über alternierende Desaturierungen und Elongationen. Die orangen Zahlen und Pfeile kennzeichnen den prozentualen Anstieg der einzelnen Fettsäuren. n3-Familie: ALA – α -Linolensäure, ODTA – Octadecatetraensäure, ETA – Eicosatetraensäure, EPA – Eicosapentaensäure, DPA – Docosapentaensäure, DHA - Docosahexaensäure. n6-Familie: LA – Linolsäure, GLA – γ -Linolensäure, EDA – Eicosadiensäure, DGLA – Dihomo- γ -Linolensäure, DDA – Docosadiensäure, AA – Arachidonsäure, DTA – Docosatetraensäure, ADA – Adrensäure.

Dass die Supplementierung der Zellen mit ALA (C18:3n3) eine Erhöhung des Gehaltes an EPA (C20:5n3) und Docosapentaensäure (DPA, C22:5n3), dem Elongationsprodukt der EPA, bewirkte, lässt vermuten, dass die $\Delta 5$ -Desaturase der C2-Zellen n3-Fettsäuren umsetzt, n6-Fettsäuren dagegen kaum bzw. nur in sehr geringem Maße. Dies ist wiederum ein Indiz für die bevorzugte Umwandlung der n3-Fettsäuren durch die $\Delta 6$ - und $\Delta 5$ -Desaturasen. Untersuchungen an Kardiomyozyten (Bordoni *et al.*, 1996) und Monozyten (Anel *et al.*, 1990) bestätigen diese Vermutung. Es wird sogar auf eine Hemmung der $\Delta 5$ -Desaturase durch die Supplementierung der Zellen mit LA (C18:2n6) oder GLA (C18:3n6) hingewiesen (Bordoni *et al.*, 1996). Andere Autoren hingegen beschrieben einen Anstieg der Desaturaseaktivitäten durch die Supplementierung von Ratten-Hepatoma-Zellen mit 50 μ M LA (Iturralde *et al.*, 1990).

Zusammenfassend deuten die vorliegenden Ergebnisse auf eine gute Aktivität der $\Delta 6$ -Desaturase bei den C2-Zellen hin, wogegen die Aktivität der $\Delta 5$ -Desaturase nur sehr gering zu sein scheint. Dies entspricht dem für atopische Hunde beschriebenen Fettsäurenstoffwechsel (Scott *et al.*, 1997).

4.1.1.3 Vergleich des Einbaus und der Metabolisierung von PUFA bei COS-1- und C2-Zellen

Beide Zelllinien zeigten nach LA- bzw. ALA-Supplementierung eine Veränderung ihres zellulären Fettsäurenmusters. Besonders bei den C2 konnte ein erhöhter Einbau der jeweils angebotenen Fettsäure und ihre Umwandlung in die längerkettigen und höher ungesättigten Metabolite nachgewiesen werden. Bei beiden Zelllinien (COS-1 und C2) war der Anstieg der Gesamt-n3-Konzentration gegenüber dem der Gesamt-n6-Konzentration erhöht. Das könnte mit der Konkurrenz der Fettsäuren um dieselben Enzymsysteme erklärt werden, da sowohl die n3-, als auch die n6-Familie dieselben Enzyme für ihren Stoffwechsel benötigen. Die n3-Fettsäuren werden aber, im Gegensatz zu den n6-Fettsäuren, von den $\Delta 6$ - und $\Delta 5$ -Desaturasen bevorzugt (Das, 2006a). Daher können schon geringe Konzentrationen von ALA die Umsetzung von LA unterdrücken (Mohrhauer *and* Holman, 1963). Da aber durch die Nahrung LA in größerer Menge aufgenommen wird als ALA, wird diese Fettsäure oft auch überwiegend umgewandelt (Burdge, 2004). Auch andere Autoren beschrieben den unterschiedlichen Einbau von Fettsäuren in zelluläre Lipide, wobei ein deutlich bevorzugter Einbau von ALA gegenüber LA festgestellt wurde (Kelley *et al.*, 1995). Bei lymphoblastischen Leukämiezellen von Ratten wurde durch die Supplementierung des Kulturmediums mit ALA eine Reduktion des relativen LA-Gehaltes verursacht (Kelley *et al.*, 1995) und in einer Fütterungsstudie an Ratten wurde im Plasma der Tiere die Verdrängung der LA durch die ALA gemessen (Ghafoorunissa *et al.*, 2005). Dass LA wiederum bevorzugt gegenüber Ölsäure eingebaut wird, wurde an Keratinozyten gezeigt (Schurer *et al.*, 1999). Eine weitere Erklärung für den bevorzugten Einbau verschiedener Fettsäuren könnte der Transport über die Plasmamembran liefern. Dieser Transport erfolgt über Proteine, die mit der Plasmamembran assoziiert sind, wie z. B. das Fettsäurenbindungsprotein (engl.: *fatty acid binding protein*, FABP), das Fettsäuretransportprotein (engl.: *fatty acid transport protein*, FATP) oder die Fettsäuretranslokase (engl.: *fatty acid translocase*, FAT/CD36) (Hui *and* Bernlohr, 1997). Diese Proteine könnten eine Fettsäurespezifität besitzen und zell- oder gewebespezifisch verteilt sein (Koonen *et al.*, 2005). So könnte in den COS-1-Zellen auch ein Transportprotein mit hoher ALA-Spezifität vorhanden sein, da ALA im Verhältnis gesehen stärker in die Zellen eingebaut wurde, als LA. Auch mit der unterschiedlich starken Verwertung beider Fettsäuren über die β -Oxidation könnte der variierende prozentuale

Umsatz zu erklären sein, da die ALA stärker der β -Oxidation unterliegt, als die LA.

Abschließend kann gesagt werden, dass die COS-1 im Gegensatz zu den C2 wahrscheinlich eine nur sehr geringe $\Delta 6$ -Desaturaseaktivität aufweisen und die ihnen angebotenen Fettsäuren vorwiegend über Elongasen metabolisieren. Die dabei entstehenden Produkte weichen von denen des Haupt-Fettsäurenstoffwechsels ab. Die C2 weisen eine gute $\Delta 6$ -Desaturaseaktivität auf, zeigen allerdings eine verminderte $\Delta 5$ -Desaturaseaktivität, was dem Stoffwechsel epidermaler Mastzellen atopischer Hunde entspricht.

4.2 *Einfluss von Mastoparan und unterschiedlichen Fettsäuren-supplementierungen auf PLD*

4.2.1 Einfluss von Mastoparan und unterschiedlichen Fettsäuren-supplementierungen auf die intrazelluläre Lokalisation von PLD1 und PLD2

Die PLD wird beschrieben als ein peripheres Membranprotein, das eine enge Beziehung zu Membranen aufweist, ohne aber eine Membran-durchspannende Domäne zu besitzen (Liscovitch *et al.*, 1999). Um zu untersuchen, inwieweit Mastoparan und die unterschiedlichen Fettsäurensupplementierungen auf die intrazelluläre Lokalisation der PLD wirken, wurden COS-1-Zellen mit beiden PLD-Isoformen transient transfiziert. Für die Detektion in den Zellen wurde die PLD-DNA an das grün fluoreszierende pEGFP gebunden (Sarri *et al.*, 2003), das als so genannter Shuttlevektor (d.h. die Vermehrung der DNA findet in Bakterien statt und in den eukaryotischen Zellen lediglich die Expression) diente. Die Transfektion wurde mit dem polykationischen Transfektionsreagenz DEAE-Dextran (McCutchan *and* Pagano, 1968) durchgeführt. Diese Methode nutzt die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen DEAE-Dextran und dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der Nukleinsäuren für die Ausbildung von Komplexen, die an die negativ geladene Zelloberfläche binden und durch Endozytose von den Zellen aufgenommen werden können. Diese Methode ist sehr preiswert und ohne großen technischen Aufwand durchführbar, worin ihr großer Vorteil begründet liegt. Nachteilig ist, dass DEAE-Dextran und Chloroquin eine zytotoxische Wirkung besitzen, weshalb die Inkubationszeiten begrenzt sind. Es gibt eine Vielzahl von weiteren Methoden für das Einschleusen von DNA in eukaryotische Zellen, wie z. B. Lipofektion, Elektroporation, Mikroinjektion oder virale Systeme. Diese sind allerdings in der Regel mit einem hohen apparativen bzw. finanziellen Aufwand verbunden. Die Effizienz

der Methode ist sehr stark vom Zelltyp und den jeweiligen Bedingungen abhängig. Die C2-Zellen beispielsweise waren aufgrund der Tatsache, dass es sich um Suspensionszellen handelt, unter dem Einsatz der verschiedenen genannten Methoden nicht transfizierbar. Auch die mikroskopische Darstellung der PLD-Fluoreszenz war in lebenden C2-Zellen nahezu unmöglich. Deshalb wurden die sehr effizient transfizierbaren COS-1-Zellen für die Transfektion einschließlich der anschließenden konfokalen Auswertung verwendet.

Interessanterweise zeichnen sich die beiden PLD-Isoformen durch eindeutige Unterschiede in ihrer intrazellulären Lokalisation aus. Im Einklang zu anderen Studien konnte festgestellt werden, dass PLD1 hauptsächlich in intrazellulären vesikulären Strukturen, aber nicht an der Zelloberfläche lokalisiert war. In verschiedenen Zelllinien ist PLD1 als vesikulär in den Zellen lokalisiert (in Golgi-Apparat, Endoplasmatischem Retikulum [ER], frühen und späten Endosomen) beschrieben worden (Colley *et al.*, 1997; Freyberg *et al.*, 2001; Lucocq *et al.*, 2001; Sung *et al.*, 1999b). Auch an RBL-2H3-Zellen wurde eine vesikuläre Verteilung der PLD1 beschrieben, hauptsächlich in lysosomalen Vesikeln, welche die Funktion sekretorischer Vesikel nach der Stimulation der Zellen übernehmen (Cockcroft, 2001). In anderen Studien zeigte PLD1-GFP in der selben Zelllinie ebenfalls eine punktförmige Verteilung ohne Lokalisationen an Plasmamembran oder Nukleus (Brown *et al.*, 1998). Weitere Veröffentlichungen postulieren, dass die PLD in der Golgi-Region lokalisiert ist (Ktistakis *et al.*, 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde die PLD1 teilweise in Kolo-kalisation mit GT-DsRed, einem Marker für das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) (Jacob *and* Naim, 2001) beobachtet. Nach der Stimulation der Zellen mit Mastoparan kam es zu einer Translokation der PLD1-Vesikel, wogegen bei den TGN-Vesikeln keine Ortsveränderung zu erkennen war. Man kann daher vermuten, dass die vesikulären Strukturen von PLD1-GFP und GT-DsRed nicht wirklich kolo-kalisiert, sondern sich nur überlagert haben und so die Gelbfärbung der Vesikel zustande kam. Andere Untersuchungen deuten an, dass die katalytische Aktivität der PLD die Freisetzung von Vesikeln aus dem TGN vermittelt. Es wird dabei vermutet, dass die enzymatisch aktive PLD und PA, das Produkt der PC-Hydrolyse, für die Freisetzung sekretorischer Vesikel aus dem TGN (Chen *et al.*, 1997) und die Rekrutierung von Hüllproteinen zu den Golgi-Membranen (Ktistakis *et al.*, 1996) notwendig sind. Die Lokalisation der PLD am Golgi-Apparat würde also mit der Vermutung übereinstimmen, dass sie eine Funktion bei der Regulation des Vesikeltransportes übernimmt (Freyberg *et al.*, 2001). Andere Arbeitsgruppen wiederum haben weder TGN 38 (einen Marker für ein integrales Membranprotein des TGN) noch Mannosidase II (exprimiert im medialen Kompartiment des Golgi-Stapels) mit PLD1-GFP kolo-kalisiert gefunden (Brown *et al.*, 1998). Dennoch wird der PLD eine Rolle bei der Exozytose zugeschrieben (Fensome *et al.*, 1996). Daher wurde die PLD-Lokalisation schon in früheren Studien im Vergleich mit sekretorischen und lysosomalen Markern untersucht,

wobei wieder, im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, eindeutige Kollokationen festgestellt werden konnten (Brown *et al.*, 1998). In Maus-Makrophagen war sowohl die endogene als auch die überexprimierte PLD1 hauptsächlich an intrazellulären Vesikeln lokalisiert, was mittels konfokaler Mikroskopie an lebenden und fixierten Zellen nachgewiesen wurde (Corrotte *et al.*, 2006). In den lebenden Zellen wurden diese Vesikel als endosomales / lysosomales Kompartiment identifiziert. Damit übereinstimmend wurde in früheren Arbeiten auch die PLD-Aktivität als mit dem endosomalen / lysosomalen Kompartiment assoziiert beschrieben (Arneson *et al.*, 1999). Es wird allerdings diskutiert, dass die PLD-Überexpression Membranbindungsstellen absättigt, was dann zu einer Mislokation des Enzyms führt (Freyberg *et al.*, 2001). Dieselbe Arbeitsgruppe ist auch der Ansicht, dass die PLD-Überexpression möglicherweise toxisch ist, was zu einem starken Anstieg der PA-Synthese in dafür nicht geeigneten Organellen führt. Solche Zellen könnten die Überexpression durch den Abbau des Enzyms über das lysosomale Kompartiment kompensieren. Klar ist, dass die subzelluläre Lokalisation von PLD1 und PLD2 vom jeweiligen Zelltyp abhängig ist und die Epitop-gebundenen Varianten von PLD1 und PLD2 nicht unbedingt die Lokalisation der endogen exprimierten Enzyme reflektieren (McDermott *et al.*, 2004).

Wie auch in der vorliegenden Arbeit konnte in unstimulierten RBL-2H3-Zellen keine Membranfluoreszenz von PLD1-GFP beobachtet werden. Die Stimulation der Zellen durch IgE-Rezeptor-Ligation oder PMA induzierte aber die Translokation eines großen Teils von PLD1-GFP zur Plasmamembran (Brown *et al.*, 1998). Diese Beobachtungen konnten auch an den COS-1-Zellen gemacht werden. Nach einer Stimulation der Zellen mit Mastoparan in einer Endkonzentration von 25 μ M hatte sich innerhalb einer Stunde ein Großteil des PLD1-GFP an die Plasmamembran verlagert. Das bekräftigt die Vermutung, dass PLD1 am sekretorischen Transportprozess beteiligt ist. Es gibt biochemische Hinweise darauf, dass die PLD bei der Vesikelbildung und deren Transport zur Membran eine Rolle spielt (Griffiths, 1996). In einer Studie an COS-7-Zellen wurde PLD1 überexprimiert, die Zellen anschließend stimuliert und, im Gegensatz zu anderen Studien, über mehrere Stunden beobachtet. Dabei wurde, wie auch in anderen Arbeiten, festgestellt, dass sich zunächst nach 2-stündiger Stimulation ein Großteil der PLD1 zur Plasmamembran und zu peripheren Vesikeln verlagert hatte. Nach weiteren 2 h war aber nahezu die gesamte PLD1 wieder zu den perinukleären Vesikeln zurückgekehrt (Du *et al.*, 2003). Der hinter dieser alternierenden Lokalisation der PLD1 befindliche Mechanismus ist gegenwärtig noch nicht bekannt, zumal Mastoparan nicht direkt auf PLD1 wirkt, sondern als selektiver Stimulator der PLD2 bekannt ist (Chahdi *et al.*, 2003). Es wäre allerdings möglich, dass PLD1 indirekt über PLC aktiviert wird und die Bildung von IP₃ und DAG letztendlich die Form der Interaktion von PLD1 mit der Membran beeinflusst, was dann in einer veränderten Proteinsortierung resultiert. Membranmikrodomänen wird eine

wichtige Rolle bei den Vorgängen der Proteinsortierung zugeschrieben (Umebayashi, 2003). Auch eine unterschiedliche Art und Weise der Assoziation von PLD1 und PLD2 mit der Membran könnte eine Erklärung für die unterschiedliche zelluläre Lokalisation beider Proteine liefern.

PLD2 wurde in der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zu PLD1 an der Plasmamembran lokalisiert beobachtet, was mit anderen Studien an Mäuse-, Ratten- und menschlichen Zellen (Cockcroft, 2001; Du *et al.*, 2004; Sarri *et al.*, 2003) übereinstimmt. Auch in weiteren Untersuchungen an PC12-Zellen, HeLa-Zellen und Rattenembryo-Fibroblasten war die PLD2 an der Plasmamembran lokalisiert (Colley *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2002; Honda *et al.*, 1999), wogegen sie in HT29-cl19A-Epithelzellen am Golgi-Kompartiment (Denmat-Ouisse *et al.*, 2001) und in PAE-Zellen (engl.: *peripheral antigen expressing cells*) im submembranösen vesikulären Kompartiment (Divecha *et al.*, 2000) lokalisiert war. Im Gegensatz zu PLD1 veränderte sich die Lokalisation der PLD2 in den Zellen durch die Stimulation mit Mastoparan nicht. Die meisten Arbeiten (wie auch die vorliegende) wurden mit Maus-PLD2 durchgeführt, da diese die zuerst klonierte und am weitesten verbreitete Isoform ist, für die auch die größte Serie mit mutierten Allelen existiert. Um zu untersuchen, ob sich die PLD2 von Mensch und Ratte unterschiedlich verhalten, wurde die PLD2 von Maus, Ratte und Mensch parallel in COS-7-Zellen transfiziert (Du *et al.*, 2004). Dabei wurde festgestellt, dass alle drei Isoformen gleichermaßen an der Plasmamembran lokalisiert waren. Trotz Unterschieden in der Sequenz der Isoformen scheint das Lokalisationsmuster also nicht beeinflusst zu werden.

Die Supplementierung des Zellkulturmediums mit den essentiellen Fettsäuren Linol- und α -Linolensäure hatte einen Einfluss auf die Lokalisation der PLD1 nach der Stimulation der Zellen mit Mastoparan. Während bei unstimulierten Zellen keine Veränderung des PLD1-Verteilungsmusters in Fettsäuren-supplementierten Zellen beobachtet werden konnte, zeigte sich nach der Stimulation der Zellen mit Mastoparan ein deutlicher Unterschied. Es konnte keine Translokation der Vesikel hin zur Plasmamembran mehr beobachtet werden. Dass die beobachteten Veränderungen auf das Ethanol (0,1 %) zurückzuführen sind, in dem die Fettsäuren gelöst wurden, kann ausgeschlossen werden, da eine Ethanol-Kontrolle (DMEM-EtOH) mitgeführt wurde. In Zellen, die in diesem Medium kultiviert wurden, zeigten beide PLD-Isoformen das selbe Verhalten wie in Zellen, die nur im Grundmedium (DMEM) kultiviert wurden. Dies lässt vermuten, dass sich durch die Supplementierung des Zellkulturmediums mit den Fettsäuren die Zusammensetzung der Vesikelmembran verändert hat und diese Veränderung eine Translokation der Vesikel zur Plasmamembran verhindert. Welcher Mechanismus genau hinter dieser Veränderung steht, konnte in dieser Arbeit noch nicht geklärt werden und muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Ein erster Ansatz könnte die

Annahme aus einer Untersuchung an Monozyten sein, dass PLD1 in hohem Maße mit *Lipid rafts* assoziiert und PLD2 weitgehend in anderen Bereichen der Membranen lokalisiert ist (Diaz *et al.*, 2002). In der genannten Studie wurden die Zellen mit DHA (C22:6n3) angereichert und man beobachtete eine stark veränderte PLD-Aktivität. Weniger als 30 % der gesamten Aktivität schien mit den *Lipid rafts* assoziiert zu sein und auch die Verteilung des Proteins in der Zelle veränderte sich. Für eine Assoziation der PLD mit *Lipid rafts* spricht auch die Tatsache, dass PLD acyliert ist. Wie schon unter 1.3.1.2 erwähnt, können Proteine über ihre acylierten Seitenketten mit *Lipid rafts* assoziieren. Wenn sich nun, z. B. durch eine exogene Fettsäurezufuhr, die Fettsäurezusammensetzung der Zellmembranen verändert, wie es in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird, hat dies auch Konsequenzen für die *Lipid rafts*. *In vitro*-Untersuchungen an T-Zellen konnten nachweisen, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren acylierte Proteine aus den *Lipid rafts* durch die veränderte Zusammensetzung der Mikrodomänenmembran verdrängen können (Li *et al.*, 2006; Stulnig *et al.*, 2001). Es wird angenommen, dass die Fettsäuren Sphingolipide aus den *Lipid rafts* verdrängen und die Assoziation der Proteine daher erschwert wird (Fan *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2004).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in den vorliegenden Untersuchungen beobachtete intrazelluläre Lokalisation von PLD1 und PLD2 mit aus der Literatur bekannten Angaben übereinstimmt. PLD1 war in den COS-1 vorwiegend in vesikulären Strukturen organisiert, wogegen sich PLD2 an der Plasmamembran befindet, was seine Ursache darin haben könnte, dass PLD1, im Gegensatz zu PLD2, vorwiegend mit *Lipid rafts* assoziiert ist. Auch können die Angaben anderer Autoren (Brown *et al.*, 1998; Du *et al.*, 2003) bestätigt werden, dass sich PLD1 nach einer Stimulation der Zellen an die Zellmembran verlagert. Bei PLD2 zeigte sich dagegen keine Veränderung der Lokalisation. Die Supplementierung des Zellkulturmediums mit den essentiellen Fettsäuren LA (C18:2n6) und ALA (C18:3n3) verhinderte die Translokation von PLD1 nach der Zellstimulation an die Plasmamembran. Die Ursache hierfür könnte in der veränderten Zusammensetzung der *Lipid rafts* begründet liegen, mit denen PLD1 assoziiert ist.

4.2.2 Einfluss von Mastoparan und Fettsäurensupplementierung auf die enzymatische Aktivität der PLD

Es ist bekannt, dass die PLD einer Regulation durch Fettsäuren unterliegt (Benzaria *et al.*, 2007). Um festzustellen, ob sich auch die Supplementierung des Zellkulturmediums mit LA und ALA auf die Aktivität der PLD in den Zellen auswirkt, wurde die Transphosphatidylierungsrate beider Zelllinien in unsupplementierten und mit LA- bzw. ALA supplementierten Zellen bestimmt. Dabei wurde auch untersucht, welchen Einfluss die Stimulation mit Masto-

paran auf beide Zelllinien ausübt. Es handelte sich bei diesen Versuchen also nicht um die akuten Effekte der Fettsäuren, sondern es wurde der Einfluss untersucht, den die Fettsäuren nach ihrem Einbau in die zellulären Lipide auf die Zellen ausüben. Bei unstimulierten COS-1-Zellen, die im unsupplementierten Medium (DMEM) kultiviert wurden, konnte nur ein geringer Umsatz an [^3H]Phosphatidylbutanol ([^3H]PBut) gemessen werden. Nach der Stimulation der Zellen mit Mastoparan (25 μM , 1 h) stieg der Anteil an [^3H]PBut und somit die PLD-Aktivität um etwa das 9-fache an. Die PLD-Aktivität wird durch Faktoren wie Phosphoinositole, Fettsäuren, GTPasen, PKC, Ca^{2+} und Phosphorylierung reguliert. Vor einiger Zeit konnte an RBL-2H3-Zellen durch Antigen-Stimulation nachgewiesen werden, dass PLD1b selektiv mit den G-Proteinen Rac1 und ARF6 sowie $\text{PKC}\alpha$ in aktin-reichen Strukturen an der Plasmamembran kolokalisierte, während es gleichzeitig zu einem Anstieg der PLD-Aktivität kam (Powner *et al.*, 2002). Daraus wurde gefolgert, dass PLD1b direkt und unabhängig an ihre Regulatoren bindet. Der Aktivitätsanstieg resultiert demnach aus der physikalischen Interaktion mit den Regulatoren und der anschließenden Aktivierung durch selbige.

Noch in der ersten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts wurde gezeigt, dass Ölsäure die pflanzliche PLD aktiviert (Hanahan *and* Chaikoff, 1948). Später wurde die Aktivierung durch Ölsäure auch bei Säugerzellen nachgewiesen (Kanfer, 1980; Sarri *et al.*, 2003). Weitere Studien zur Abhängigkeit der PLD-Aktivität von verschiedenen amphiphilen Lipiden stellten die Aktivierung allein durch Fettsäuren unter Beweis. Die Untersuchung der PLD aus Rattenhirn zeigte dabei, dass ungesättigte freie Fettsäuren die wirksamsten aller untersuchten Aktivatoren waren (Chalifour *and* Kanfer, 1982). Neue Untersuchungen an Ratten-Thymozyten ermittelten die Wirkung verschiedener Fettsäuren auf die PLD-Aktivität. Es handelte sich hierbei um Zellen, die aus Ratten nach einem 4-wöchigen Fütterungsversuch gewonnen wurden. Die Ratten bekamen eine Fischöl-, Arganöl-, Olivenöl-, Kokosnussöl- bzw. Sonnenblumenöl-Diät; die Fischöl-Diät enthielt dabei die geringsten Konzentrationen an Öl- und Linolsäure. Die Thymozyten der damit gefütterten Ratten zeigten zugleich die geringste PLD-Aktivität. Bei allen anderen Zellen wurde eine höhere PLD-Aktivität festgestellt (Benzaria *et al.*, 2006). In einem weiteren Versuch wurden die Thymozyten aus den Ratten isoliert und für 2 h in Medien kultiviert, denen verschiedene Fettsäuren zugesetzt wurden. DHA, LA und Myristinsäure (C14:0) verursachten dabei eine signifikante Erhöhung der PLD-Aktivität. Nach einer 5-minütigen Stimulation der Zellen mit ConA erhöhte sich die PLD-Aktivität im Beisein aller Fettsäuren mit Ausnahme von Ölsäure, EPA und Stearinsäure (C18:0) (Benzaria *et al.*, 2007). Auch wenn diese Resultate die akuten Effekte von Fettsäuren auf die PLD-Aktivität zeigen, unterstützen sie doch die Ergebnisse, die in der vorliegenden Arbeit an COS-1-Zellen erhalten wurden. Nach der 4-tägigen Kultivierung der COS-1 mit LA oder ALA konnte nach Stimulation der Zellen mit Mastoparan eine deutlich erhöhte PLD-Aktivität im Vergleich

zu den nicht supplementierten Zellen beobachtet werden. Auch Untersuchungen an glatten Muskelzellen von Schweinen (Askari *et al.*, 2002), BHK- (Hamsternierenzellen, engl.: *baby hamster kidney*) Zellen (Wang *and* Oram, 2005), RBL-2H3-Mastzellen (Sarri *et al.*, 2003), U937 und L1210 (Kim *et al.*, 1999b) stellten klar den Einfluss von Öl-, Linol- und Arachidonsäure auf die PLD-Aktivität unter Beweis. Der Effekt von α -Linolensäure wurde bei diesen Studien nicht untersucht, so dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit über den Anstieg der PLD-Aktivität nach der Supplementierung mit α -Linolensäure neu sind. Inwiefern diese erhöhte PLD-Aktivität auf die Aktivierung durch PLD1 oder PLD2 zurückzuführen ist, konnte mit der angewendeten Methode nicht ermittelt werden, da nur die Gesamt-PLD-Aktivität gemessen wurde. Verschiedene Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen deuten allerdings an, dass nur die Aktivität der PLD2 Subjekt des Einflusses von ungesättigten Fettsäuren ist (Kim *et al.*, 1999b; Sarri *et al.*, 2003). Die ungesättigten Fettsäuren werden durch Fettsäuren-Transferproteine in die Zelle transportiert und zu ihren Acyl-CoA-Derivaten umgewandelt, von denen einige in Pools Phosphatidylcholin (PC)-enthaltender ungesättigter Acylseitenketten eingebaut werden. Diese Acyl-CoAs aktivieren PLD2 ebenfalls, was als *Feed-Forward-Mechanismus* für die Bildung von Phosphatidsäure (PA) und Diacylglycerol (DAG) fungiert, die sich in den ungesättigten Acylgruppen angereichert haben (Wang *and* Oram, 2005). Die Annahme, dass die Erhöhung der PLD-Aktivität auf PLD2 zurückzuführen ist, wird durch die quasi nicht vorhandene basale PLD1-Aktivität unterstützt (Colley *et al.*, 1997). Die Verwendung von Mastoparan für die Stimulation der PLD-Aktivität in den COS-1-Zellen untermauert diese Vermutung, da Mastoparan als selektiver Stimulator der PLD2 (Chahdi *et al.*, 2003) bekannt ist. Der sehr starke Anstieg der PLD-Aktivität nach der Stimulation der COS-1 im Grundmedium (DMEM) mit Mastoparan ist demnach also auf eine erhöhte PLD2-Aktivität zurückzuführen. Demgegenüber steht aber, dass in Untersuchungen anderer Autoren die sehr hohe basale PLD2-Aktivität (etwa 1.500-fach höher als PLD1) nur um das 1,5 – 2-fache gesteigert werden konnte (Colley *et al.*, 1997; Lopez *et al.*, 1998; Sung *et al.*, 1999a), während die Stimulation von PLD1 eine Aktivitätssteigerung um das 10 – 15-fache bewirkte (Colley *et al.*, 1997).

Die signifikant höhere PLD-Aktivität in Zellen, die mit Linol- oder α -Linolensäure supplementiert waren, könnte auf die additive Wirkung von Mastoparan und den C18-PUFA zurückzuführen sein. Untersuchungen anderer Autoren wiesen einen mehr als 4-fachen Anstieg der PLD-Aktivität nach der Stimulation mit Mastoparan nach. Durch Zugabe von Linolsäure konnte dieser Anstieg nochmals erhöht werden (Wang *and* Oram, 2005). Neben PLD2 aktiviert Mastoparan auch die Phospholipase A2 (Argiolas *and* Pisano, 1983; Guild, 2001), was zu erhöhten intrazellulären PUFA-Konzentrationen führt (Gueck *and* Fuhrmann, 2005). Diese PUFA könnten die PLD zusätzlich aktivieren. Die Aktivierung der PLD durch eine PLA2-

abhängige PUFA-Freisetzung wurde an Herzmuskelzellen von Ratten beschrieben (Liu *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu wurde bei Membranpräparationen von RBL-2H3-Zellen, die sowohl mit Mastoparan als auch mit Ölsäure inkubiert wurden, ein inhibitorischer Effekt der Ölsäure auf die Mastoparan-stimulierte PLD2-Aktivität beobachtet (Chahdi *et al.*, 2003). Allerdings wurden in dieser Studie Ölsäure-Konzentrationen zwischen 0,1 und 0,5 mM eingesetzt. Unter physiologischen Bedingungen sind die intrazellulären Konzentrationen freier Fettsäuren wesentlich geringer (Jump *et al.*, 2005). Das wurde an primären Hepatozyten von Ratten gezeigt, bei denen die intrazellulären Konzentrationen freier Fettsäuren in fM-Bereichen liegen (Pawar *and* Jump, 2003). Durch die Stimulation von PLA2 nehmen die freien Fettsäuren zu, jedoch nicht über den pM-Bereich hinaus (de Carvalho *et al.*, 1995). Somit kann davon ausgegangen werden, dass bei den COS-1, auch nach der angenommenen Stimulation der PLA2, die Konzentration freier Fettsäuren sehr gering gewesen ist. Aber gerade diese geringen Konzentrationen scheinen die PLD-Aktivität zu erhöhen. Auch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen beschrieben eine inhibitorische Wirkung der Ölsäure (Diaz *et al.*, 2002; Kodaki *and* Yamashita, 1997). Diese Untersuchungen wurden allerdings durchgeführt, kurz nachdem die Zellen mit hohen Ölsäure-Konzentrationen (1 mM und 2 mM) inkubiert wurden. Dieser konzentrationsabhängige Effekt von Fettsäuren mit einer Erhöhung der PLD-Aktivität bis 0,5 mM und der Inhibierung bei Konzentrationen, die über diesen Wert hinausgehen, wurde an Membranfraktionen von RBL-2H3-Zellen gezeigt (Sarri *et al.*, 2003). Die optimale PLD-Aktivierung stellten andere Autoren bei einer Inkubation der Zellen mit Öl-, Linol- oder Arachidonsäure in einer Konzentration von 20 μ M fest (Kim *et al.*, 1999b). Diese Konzentration wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Aber die supplementierten Fettsäuren wurden während der 4-tägigen Kultivierungszeit in die zellulären Lipide eingebaut und in ihre jeweiligen Metabolite umgewandelt. Auch wurde keine Ölsäure verwendet, da die Zellen mit 10 % FKS kultiviert wurden und somit schon etwa 17 μ M Ölsäure im Medium enthalten war.

Der Anstieg der PLD-Aktivität bei den COS-1 nach Mastoparanstimulation ist vermutlich nicht auf den alleinigen Anstieg der PLD2-Aktivität zurückzuführen, da PLD2 bekanntlich eine hohe basale Aktivität hat, die nur begrenzt stimuliert werden kann (Colley *et al.*, 1997). Andererseits hat PLD1 eine sehr geringe Grundaktivität, die durch verschiedene Stimulanzen aktiviert werden kann (McDermott *et al.*, 2004). So stellt sich die Frage, ob nicht auch PLD1 an dem allgemeinen Anstieg der PLD-Aktivität beteiligt könnte. Da aber erwiesen ist, dass Mastoparan spezifisch und direkt die PLD2 aktiviert, könnte eine indirekte Wirkung von Mastoparan auf PLD1 vermutet werden. Der Anstieg der Aktivität könnte beispielsweise durch die Interaktion von verschiedenen Phospholipasen, wie der Phospholipase C (PLC), zustande kommen. Demnach könnte folgende Signalkaskade zustande kommen: Zuerst

bewirkt die Stimulation der COS-1 durch Mastoparan die Aktivierung der PLA2. Diese wiederum setzte PUFA aus Membranphospholipiden frei. Die freigesetzten PUFA stimulierten die PLC (Murthy *et al.*, 2006), was zur Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) führt. DAG ist ein Aktivator der Proteinkinase C (PKC) und diese wiederum aktiviert die PLD. Die erhöhte PLD-Aktivität bei Zellen, die mit Linol- oder α -Linolensäure supplementiert waren, könnte also mit der Wirkung der PUFA auf die PKC zusammenhängen. Andererseits zeigen Ergebnisse einer Arbeit, die den Einfluss von DHA auf PBMC (engl.: *peripheral blood mononuclear cells*, Monozyten) untersuchte, dass die durch DHA induzierte PLD-Aktivität PKC-unabhängig ist (Diaz *et al.*, 2002). Sie wurde weder durch PKC-Inhibitoren, noch durch Herunterregulierung dieses Enzyms beeinflusst. Allerdings beobachtete man einen Verlust der PLD-Aktivität bei DHA-supplementierten PBMC, wenn diesen GTP und die kleinen G-Proteine fehlten. Daher wurde besonderes Augenmerk auf die Rolle von ARF bei diesem Mechanismus gelegt. Mit Hilfe von Anti-ARF 1-3-Antikörpern konnte in Western Blot-Analysen gezeigt werden, dass DHA und ConA zusammenwirken, um ARF-Proteine zu bestimmten Bereichen in den PBMC zu rekrutieren. Auch war der partielle Anstieg von ARF dosisabhängig an die DHA-Anreicherung in den Zellmembranen gekoppelt, was ein weiteres Indiz für die Bedeutung von ARF bei der DHA-induzierten PLD-Aktivierung ist. Hier könnte auch eine Erklärung für den Anstieg der PLD-Aktivität nach LA- bzw. ALA-Supplementierung liegen. Die Autoren vermuten weiterhin, dass es sich bei der Erhöhung der PLD-Aktivität in ihren Untersuchungen um PLD1 handelt, da neben der Beteiligung von ARF-Proteinen keine Ölsäure-stimulierte PLD in PBMC-Lysaten gefunden werden konnte. Ein Einfluss von PLD2 konnte dabei aber nicht völlig ausgeschlossen werden, da sie bei einigen Zellarten durch ARF aktiviert werden kann, wenn auch in geringerem Maße als PLD1 (Lopez *et al.*, 1998).

Bei den C2-Zellen ergab die Messung der PLD-Aktivität ein komplett anderes Ergebnis, verglichen mit den COS-1-Zellen. Die PLD-Aktivität im Grundmedium (DEH) war im Vergleich zu den COS-1-Zellen um etwa das 20-fache erhöht. Ein Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen konnte in diesem Medium nicht verzeichnet werden (Abb. 26). Nach der Fettsäuresupplementierung verhielten sich die C2 im Vergleich zu den COS-1 eher umgekehrt. Bei unstimulierten Zellen im DEH-ALA konnte, verglichen mit DEH, eine um etwa das 1,3-fache verminderte PLD-Aktivität nachgewiesen werden, die nach erfolgter Stimulation um etwa das 1,5-fache anstieg. Bei C2, die im DEH-LA kultiviert wurden, war die PLD-Aktivität im Vergleich zum DEH ca. 3,6-fach reduziert und stieg nach der Stimulation der Zellen mit Mastoparan ca. 2,8-fach an. Bei den C2 handelt es sich um eine Suspensionszelllinie. Aus diesem Grund waren diese Zellen bei den durchgeführten Untersuchungen im Vergleich zu den adhärennten COS-1-Zellen erhöhtem Stress ausgesetzt. Denn nach einer

Reihe von Arbeitsschritten musste eine Zentrifugation erfolgen (beispielsweise um Medium zu entfernen). Es ist auch zu vermuten, dass bei diesen Zentrifugationsschritten ein Teil der Zellen funktionell beeinträchtigt worden ist, was die hohen Standardabweichungen erklären könnte.

4.3 *Fazit und Ausblick*

Die Fettsäurezusammensetzung der Zellmembranen bestimmt ihre Fluidität und hat einen Einfluss auf zelluläre Rezeptoren und Signalmoleküle. Die daraus entstehenden Mediatoren beeinflussen ihrerseits die Proteinaktivität. Die Annahme, dass PLD1 mit *Lipid rafts* assoziiert ist, während PLD2 in anderen Bereichen der Zellmembran lokalisiert ist (Diaz *et al.*, 2002), könnte die unterschiedliche Lokalisation beider Proteine in den Zellen erklären. Die Supplementierung der Zellkulturmedien mit LA und ALA und die 4-tägige Kultivierung der Zellen in diesen Medien veränderte die Zusammensetzung der zellulären Lipide, der Zellmembranen und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die Zusammensetzung der Mikrodomänen (*Lipid rafts*) in den Zellmembranen. Dies verursachte eine partielle Verdrängung der PLD1 aus den Mikrodomänen und ihre veränderte Lokalisation in den Fettsäuren-supplementierten Zellen nach der Stimulation mit Mastoparan. Gleichzeitig führte die Fettsäuresupplementierung zu einer Erhöhung der PLD-Aktivität in stimulierten Zellen gegenüber den im Grundmedium kultivierten Zellen. Dieser Prozess könnte Teil der immunsuppressiven Effekte der Fettsäuren sein und helfen, die Modulation der Signaltransduktion durch PUFA zu erklären. Für diese Ereignisse ist ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren verantwortlich. Auf der einen Seite aktiviert Mastoparan PLA2, PLC sowie G-Proteine und verursacht die Lyse von Phosphoinositolen durch die Interaktion mit *Lipid rafts* (siehe 1.4). Auf der anderen Seite regulieren G-Proteine und Phosphoinositole neben PKC die Aktivität beider PLD-Isoformen (siehe 1.2.1.3). Die genauen Mechanismen, die hinter der PUFA-induzierten PLD-Aktivierung und der Verdrängung der PLD aus den *Lipid rafts* stehen, müssen Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Auch ist noch unklar, wodurch die alternierende Lokalisation von PLD1 in unstimulierten und stimulierten COS-1-Zellen zustande kommt. In weiterführenden Studien sollte geklärt werden, welchen biochemischen Einfluss LA und ALA auf die Zusammensetzung der *Lipid rafts* ausüben. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob PLD sich in stimulierten und unstimulierten Zellen in den *Lipid rafts* nachweisen lässt und wie sich die Situation nach der Supplementierung der Zellen mit LA und ALA verändert. Auch muss untersucht werden, welche PLD-Isoform für die Erhöhung der PLD-Aktivität in stimulierten Zellen verantwortlich ist und ob nach der Supplementierung mit LA oder ALA eine Veränderung auftritt.

5 Zusammenfassung

Phospholipase D (PLD) ist ein rezeptorreguliertes Signalenzym, das an einer Reihe biologischer Funktionen wie Exozytose, Phagozytose, Vesikelsekretion und Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt ist. PLD katalysiert die Spaltung von Phosphatidylcholin (PC) zu Phosphatidsäure (PA) und Cholin und ist damit an der Bildung wichtiger *second messenger* beteiligt. Von Säugern wurden zwei PLD-Isoformen kloniert, PLD1 und PLD2. Aus früheren Studien mit GFP-Fusionsplasmiden ist bekannt, dass PLD2 an der Plasmamembran lokalisiert ist, während PLD1 intrazellulär verteilt ist. PLD scheint eine essentielle Rolle bei der Sekretion von Mastzellgranula einzunehmen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Effekt der Supplementierung der Kulturmedien von COS-1- und C2-Zellen mit den essentiellen Fettsäuren Linol- und α -Linolensäure auf die Phospholipase D (PLD) zu untersuchen. Diese Fettsäuren wirken auf molekularer Ebene unter anderem auf die zelluläre Fettsäurezusammensetzung, Membranfluidität und Rezeptoren, Lipidmediatoren, intrazelluläre Signaltransduktionswege, Enzymaktivitäten sowie die Genexpression. Durch die Untersuchung sollte festgestellt werden, (1) welchen Einfluss die zugesetzte Fettsäure auf die Fettsäurezusammensetzung der Zellen hat; (2) wie sich die PLD in den Zellen verhält, nachdem diese mit Mastoparan stimuliert worden sind; (3) welchen Einfluss die zugesetzten Fettsäuren auf die intrazelluläre Lokalisation der PLD vor und nach der Stimulation der Zellen mit Mastoparan haben und (4) welchen Einfluss die Supplementierung der Kulturmedien mit Linol- (LA) und α -Linolensäure (ALA) auf die Aktivität der PLD in den Zellen ausübt.

Die Untersuchung der Fettsäurezusammensetzung der Zellen erfolgte mittels Gaschromatographie. Transfektionen mit GFP-hPLD1 und GFP-mPLD2 wurden mit DEAE-Dextran durchgeführt. Konfokale Bilder lebender Zellen wurden 48 h nach der Transfektion an einem Leica TCS SPII Mikroskop mit einem $\times 63$ Wasser-Planapochromat-Objektiv aufgenommen. Für einige Untersuchungen erfolgte die Stimulierung der Zellen für 45 min mit Mastoparan in einer Endkonzentration von 25 μ M. Für die Messung der PLD-Aktivität wurden die Zellen mit [3 H]Myristinsäure markiert, das PLD-Reaktionsprodukt [3 H]Phosphatidylbutanol (PBut) im Vergleich zum PLD-Substrat [3 H]Phosphatidylcholin (PC) mittels Dünnschichtchromatographie ermittelt und die Radioaktivität gemessen.

Durch die Fettsäuresupplementierung verändert sich die zelluläre Fettsäurezusammensetzung. Die exogen zugeführten Fettsäuren und ihre Metabolite werden in die zellulären Lipide eingebaut. C2-Zellen metabolisieren ihre Fettsäuren über den Hauptweg des Fettsäurenstoffwechsels und haben nur eine geringe $\Delta 5$ -Desaturaseaktivität. COS-1-Zellen scheinen

im Allgemeinen eine geringe Desaturaseaktivität zu besitzen und metabolisieren ihre Fettsäuren hauptsächlich über Elongationen. An GFP gebundene PLD1 befindet sich in intrazellulären vesikulären Strukturen, während PLD2 an der Plasmamembran lokalisiert ist. Nach Stimulation der Zellen mit Mastoparan verlagert sich die PLD1-Fluoreszenz in Zellen die nicht mit den Fettsäuren supplementiert sind, an die Plasmamembran. In Zellen, deren Medien mit LA bzw. ALA supplementiert wurden, findet keine Translokation hin zur Plasmamembran statt. Die Lokalisation von PLD2 verändert sich weder nach Stimulation mit Mastoparan, noch durch die Supplementierung der Zellkulturmedien mit LA oder ALA. Wahrscheinlich ist PLD1 mit *Lipid rafts* assoziiert, wogegen PLD2 in anderen Bereichen der Membran lokalisiert ist. Durch die Zugabe von LA und ALA wird PLD1 vermutlich aus den *Lipid rafts* verdrängt und die Translokation wird verhindert. Die PLD-Aktivität wird in COS-1-Zellen durch die Stimulation der Zellen mit Mastoparan gegenüber dem Grundmedium signifikant erhöht. Die Supplementierung der Zellen mit LA und ALA bewirkt eine weitere Erhöhung der PLD-Aktivität nach Mastoparanstimulation. Bei den C2-Zellen war die PLD-Aktivität im Grundmedium gegenüber den COS-1-Zellen stark erhöht, es konnte aber kein Unterschied in der stimulierten und unstimulierten C2 im Grundmedium festgestellt werden. Unstimulierte Zellen im DEH-ALA wiesen im Vergleich zum DEH eine geringere PLD-Aktivität auf, die nach der Stimulation mit Mastoparan um ca. das 1,5-fache anstieg. Im DEH-LA kultivierte Zellen wiesen im Gegensatz zum DEH eine um das 3,6-fache verminderte PLD-Aktivität auf. Nach der Stimulation mit Mastoparan stieg die PLD-Aktivität um das 2,8-fache an. Welche PLD-Isoform für diese Aktivitätserhöhung verantwortlich ist, konnte in dieser Arbeit noch nicht geklärt werden und muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

6 Summary

Phospholipase D (PLD) is a receptor-regulated signalling enzyme involved in many biological processes, including exocytosis, phagocytosis, vesicle secretion and reorganisation of the cytoskeleton. It catalyses the hydrolysis of phosphatidylcholine (PC) to generate phosphatidic acid (PA) and choline and is thus involved in second messenger formation. Two isoforms of this enzyme have been cloned from mammals: PLD1 and PLD2. From earlier studies with GFP-fusion plasmids PLD2 is known to be located at the plasma membrane, whereas PLD1 is distributed intracellularly. PLD appears to be essential for stimulated secretion of granules from mast cells.

The aim of this study was to analyse how the membrane fatty acid pattern influences PLD when cell culture media of COS-1 and C2-cells is supplemented with the essential fatty acids linoleic and α -linolenic acid. These fatty acids influence on a molecular level the cellular fatty acid composition, membrane fluidity and receptors, lipid mediators, intracellular signal transduction pathways, enzyme activity and gene expression. During this research the following aspects were to be determined: (1) the effect of the supplemented fatty acid on the fatty acid composition of the cells; (2) how PLD behaves in cells after stimulation with mastoparan; (3) how the supplemented fatty acids influence the intracellular distribution of PLD before and after stimulation with mastoparan; (4) how PLD activity within the cells is influenced by supplementation of culture media with linoleic (LA) and α -linolenic acid (ALA).

The fatty acid composition was measured by means of gas chromatography. Transfections with GFP-hPLD1 and GFP-mPLD2 were realised with DEAE-dextrane. Confocal images of living cells were acquired two days after transfection with a Leica TCS SP11 microscope and a $\times 63$ water planapochromat lens. For some experiments cells were treated with mastoparan at a final concentration of 25 μ M for 45 min. PLD activity was analysed with [3 H]myristic acid-labelled cells. The PLD reaction product [3 H]phosphatidylbutanol (PBut) was quantified in relation to the PLD substrate [3 H]PC with thin layer chromatography and counted for radioactivity.

Due to the fatty acid supplementation the cellular fatty acid composition changed. The exogenous supplied fatty acids and their metabolites are integrated in the cellular lipids. C2 cells metabolise their fatty acids along the main path of the fatty acid metabolism and show only a minor $\Delta 5$ -desaturase activity. COS-1-cells appear to have a lower desaturase activity in general and metabolise their fatty acids mainly by means of elongations. GFP-tagged PLD1 is situated within intracellular vesicular structures, whereas PLD2 is located at the plasma membrane. After stimulation with mastoparan, PLD1 moves to the plasma mem-

brane only in cells cultured without fatty acid supplementation. In cells supplemented with LA or ALA, no translocation of PLD1 to the plasma membrane was observed. The localisation of PLD2 neither changed as a result of stimulation with mastoparan or after the supplementation of cells with LA or ALA. PLD1 is probably associated with lipid rafts, whereas PLD2 is located in different areas of the membrane. The LA and ALA supplementation might cause PLD1 to be displaced out of the lipid rafts and thus translocation is prevented. The PLD activity increased when cells were stimulated with mastoparan. In the presence of LA or ALA the PLD activity increases further while stimulated with mastoparan in comparison to DMEM. In C2, PLD activity in DEH increased strongly without stimulation, compared to COS-1, but there was no difference to stimulated cells. Cells cultured in DEH-ALA showed a lower PLD activity than compared to DEH. The activity increased by 1.5-fold after the stimulation with mastoparan. Cells cultured in DEH-ALA showed a reduced PLD-activity by 3.6-fold compared to DEH. The activity increased by 2.8-fold after mastoparan stimulation. The responsible PLD isoforms could not be determined in this study and must remain the subject of further examination.

7 Literatur

Anel,A., Naval,J., Gonzalez,B., Uriel,J., and Pineiro,A. (1990). Fatty acid metabolism in human lymphocytes. II. Activation of fatty acid desaturase-elongase systems during blastic transformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1044, 332-339.

Argiolas,A. and Pisano,J.J. (1983). Facilitation of phospholipase A2 activity by mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasp venom. *J. Biol. Chem.* 258, 13697-13702.

Argiolas,A. and Pisano,J.J. (1984). Isolation and characterization of two new peptides, mastoparan C and crabrolin, from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*. *J. Biol. Chem.* 259, 10106-10111.

Argiolas,A. and Pisano,J.J. (1985). Bombolitins, a new class of mast cell degranulating peptides from the venom of the bumblebee *Megabombus pennsylvanicus*. *J. Biol. Chem.* 260, 1437-1444.

Arneson,L.S., Kunz,J., Anderson,R.A., and Traub,L.M. (1999). Coupled inositide phosphorylation and phospholipase D activation initiates clathrin-coat assembly on lysosomes. *J. Biol. Chem.* 274, 17794-17805.

Askari,B., Carroll,M.A., Capparelli,M., Kramer,F., Gerrity,R.G., and Bornfeldt,K.E. (2002). Oleate and linoleate enhance the growth-promoting effects of insulin-like growth factor-I through a phospholipase D-dependent pathway in arterial smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 277, 36338-36344.

Awad,A.B., Basilious,B.G., Fink,C.S., and Horvath,P.J. (1994). In vitro activation and inhibition of rat colonic phospholipase D by fatty acids. *Cancer Lett.* 86, 105-109.

Baldassare,J.J., Jarpe,M.B., Alferes,L., and Raben,D.M. (1997). Nuclear translocation of RhoA mediates the mitogen-induced activation of phospholipase D involved in nuclear envelope signal transduction. *J. Biol. Chem.* 272, 4911-4914.

Banno,Y., Tamiya-Koizumi,K., Oshima,H., Morikawa,A., Yoshida,S., and Nozawa,Y. (1997). Nuclear ADP-ribosylation factor (ARF)- and oleate-dependent phospholipase D (PLD) in rat liver cells. Increases of ARF-dependent PLD activity in regenerating liver cells. *J. Biol. Chem.* 272, 5208-5213.

- Bechoua,S., Dubois,M., Nemoz,G., Lagarde,M., and Prigent,A.F. (1998). Docosahexaenoic acid lowers phosphatidate level in human activated lymphocytes despite phospholipase D activation. *J. Lipid Res.* 39, 873-883.
- Benzaria,A., Meskini,N., Dubois,M., Croset,M., Nemoz,G., Lagarde,M., and Prigent,A.F. (2006). Effect of dietary argan oil on fatty acid composition, proliferation, and phospholipase D activity of rat thymocytes. *Nutrition* 22, 628-637.
- Benzaria,A., Meskini,N., Dubois,M., Nemoz,G., Lagarde,M., and Prigent,A.F. (2007). Phospholipase D as a potential target for the antiproliferative effects of polyunsaturated fatty acids in rat thymocytes. *J. Nutr. Biochem.* 18, 228-235.
- Bi,K., Roth,M.G., and Ktistakis,N.T. (1997). Phosphatidic acid formation by phospholipase D is required for transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Curr. Biol.* 7, 301-307.
- Billah,M.M. and Anthes,J.C. (1990). The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. *Biochem. J* 269, 281-291.
- Bordoni,A., Lopez-Jimenez,J.A., Spano,C., Biagi,P., Horrobin,D.F., and Hrelia,S. (1996). Metabolism of linoleic and alpha-linolenic acids in cultured cardiomyocytes: effect of different N-6 and N-3 fatty acid supplementation. *Mol. Cell Biochem.* 157, 217-222.
- Bourre,J.M., Dumont,O.S., Piciotti,M.J., Pascal,G.A., and Durand,G.A. (1992). Dietary alpha-linolenic acid deficiency in adult rats for 7 months does not alter brain docosahexaenoic acid content, in contrast to liver, heart and testes. *Biochim. Biophys. Acta* 1124, 119-122.
- Boyer,H.W. and Roulland-Dussoix,D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol. Biol.* 41, 459-472.
- Brown,D.A. and Rose,J.K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533-544.
- Brown,F.D., Thompson,N., Saqib,K.M., Clark,J.M., Powner,D., Thompson,N.T., Solari,R., and Wakelam,M.J. (1998). Phospholipase D1 localises to secretory granules and lysosomes and is plasma-membrane translocated on cellular stimulation. *Curr. Biol.* 8, 835-838.
- Brown,H.A., Gutowski,S., Kahn,R.A., and Sternweis,P.C. (1995). Partial purification and characterization of Arf-sensitive phospholipase D from porcine brain. *J Biol. Chem.* 270, 14935-14943.

- Brown,H.A., Gutowski,S., Moomaw,C.R., Slaughter,C., and Sternweis,P.C. (1993). ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* 75, 1137-1144.
- Burdge,G. (2004). Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* 7, 137-144.
- Burr,G.O. and Burr,M.M. (1929). A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *J. Biol. Chem.* 82, 345-367.
- Bustelo,X.R., Sauzeau,V., and Berenjano,I.M. (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* 29, 356-370.
- Cai,S. and Exton,J.H. (2001). Determination of interaction sites of phospholipase D1 for RhoA. *Biochem. J* 355, 779-785.
- Calder,P.C. (1997). n-3 polyunsaturated fatty acids and cytokine production in health and disease. *Ann. Nutr. Metab* 41, 203-234.
- Calder,P.C. and Grimble,R.F. (2002). Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56 *Suppl* 3, S14-S19.
- Calder,P.C., Yaqoob,P., Thies,F., Wallace,F.A., and Miles,E.A. (2002). Fatty acids and lymphocyte functions. *Br. J. Nutr.* 87 *Suppl* 1, S31-S48.
- Campbell,K.L. (1993). Clinical use of fatty acid supplements in dogs. *Vet. Dermatol.* 4, 167-173.
- Carlson,S.E., Werkman,S.H., Peeples,J.M., Cooke,R.J., and Tolley,E.A. (1993). Arachidonic acid status correlates with first year growth in preterm infants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 1073-1077.
- Casey,P.J. (1995). Mechanisms of protein prenylation and role in G protein function. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 161-166.
- Chahdi,A., Choi,W.S., Kim,Y.M., and Beaven,M.A. (2003). Mastoparan selectively activates phospholipase D2 in cell membranes. *J. Biol. Chem.* 278, 12039-12045.
- Chalifour,R. and Kanfer,J.N. (1982). Fatty acid activation and temperature perturbation of rat brain microsomal phospholipase D. *J Neurochem.* 39, 299-305.

Chapkin,R.S. and Carmichael,S.L. (1990). Effects of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on macrophage phospholipid classes and subclasses. *Lipids* 25, 827-834.

Chen,Y.G., Siddhanta,A., Austin,C.D., Hammond,S.M., Sung,T.C., Frohman,M.A., Morris,A.J., and Shields,D. (1997). Phospholipase D stimulates release of nascent secretory vesicles from the trans-Golgi network. *J Cell Biol.* 138, 495-504.

Choi,W.S., Kim,Y.M., Combs,C., Frohman,M.A., and Beaven,M.A. (2002). Phospholipases D1 and D2 regulate different phases of exocytosis in mast cells. *J. Immunol.* 168, 5682-5689.

Clamp,A.G., Ladha,S., Clark,D.C., Grimble,R.F., and Lund,E.K. (1997). The influence of dietary lipids on the composition and membrane fluidity of rat hepatocyte plasma membrane. *Lipids* 32, 179-184.

Cockcroft,S. (2001). Signalling roles of mammalian phospholipase D1 and D2. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 1674-1687.

Cockcroft,S., Way,G., O'Luanaigh,N., Pardo,R., Sarri,E., and Fensome,A. (2002). Signalling role for ARF and phospholipase D in mast cell exocytosis stimulated by crosslinking of the high affinity FcepsilonR1 receptor. *Mol. Immunol.* 38, 1277-1282.

Colley,W.C., Sung,T.C., Roll,R., Jenco,J., Hammond,S.M., Altshuller,Y., Bar-Sagi,D., Morris,A.J., and Frohman,M.A. (1997). Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr. Biol.* 7, 191-201.

Corrotte,M., Chasserot-Golaz,S., Huang,P., Du,G., Ktistakis,N.T., Frohman,M.A., Vitale,N., Bader,M.F., and Grant,N.J. (2006). Dynamics and function of phospholipase D and phosphatidic acid during phagocytosis. *Traffic.* 7, 365-377.

Crawford,M.A., Costeloe,K., Ghebremeskel,K., Phylactos,A., Skirvin,L., and Stacey,F. (1997). Are deficits of arachidonic and docosahexaenoic acids responsible for the neural and vascular complications of preterm babies? *Am. J. Clin. Nutr.* 66, 1032S-1041S.

Cummings,R., Parinandi,N., Wang,L., Usatyuk,P., and Natarajan,V. (2002). Phospholipase D/phosphatidic acid signal transduction: role and physiological significance in lung. *Mol. Cell Biochem.* 234-235, 99-109.

Cunnane,S.C. and Anderson,M.J. (1997). The majority of dietary linoleate in growing rats is beta-oxidized or stored in visceral fat. *J. Nutr.* 127, 146-152.

- Czarny,M., Fiucci,G., Lavie,Y., Banno,Y., Nozawa,Y., and Liscovitch,M. (2000). Phospholipase D2: functional interaction with caveolin in low-density membrane microdomains. *FEBS Lett.* 467, 326-332.
- Czarny,M., Lavie,Y., Fiucci,G., and Liscovitch,M. (1999). Localization of phospholipase D in detergent-insoluble, caveolin-rich membrane domains. Modulation by caveolin-1 expression and caveolin-182-101. *J Biol. Chem.* 274, 2717-2724.
- Dallongeville,J., Bauge,E., Tailleux,A., Peters,J.M., Gonzalez,F.J., Fruchart,J.C., and Staels,B. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is not rate-limiting for the lipoprotein-lowering action of fish oil. *J Biol. Chem.* 276, 4634-4639.
- Das,U.N. (2006a). Biological significance of essential fatty acids. *J. Assoc. Physicians India* 54, 309-319.
- Das,U.N. (2006b). Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnol. J.* 1, 420-439.
- de Carvalho,M.G., Garritano,J., and Leslie,C.C. (1995). Regulation of lysophospholipase activity of the 85-kDa phospholipase A2 and activation in mouse peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* 270, 20439-20446.
- De Pablo,M.A. and De Cienfuegos,A.G. (2000). Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. *Immunol. Cell Biol.* 78, 31-39.
- Decker,C., Miro Obradors,M.J., Sillence,D.J., and Allan,D. (1996). Phorbol ester-sensitive phospholipase D is mainly localized in the endoplasmic reticulum of BHK cells. *Biochem. J* 320 (Pt 3), 885-890.
- DeMora,F., Garcia,G., Puigdemont,A., Arboix,M., and Ferrer,L. (1996). Skin mast cell releasability in dogs with atopic dermatitis. *Inflamm. Res.* 45, 424-427.
- Denmat-Ouisse,L.A., Phebidias,C., Honkavaara,P., Robin,P., Geny,B., Min,D.S., Bourgoin,S., Frohman,M.A., and Raymond,M.N. (2001). Regulation of constitutive protein transit by phospholipase D in HT29-cl19A cells. *J Biol. Chem.* 276, 48840-48846.
- Desvergne,B. and Wahli,W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* 20, 649-688.
- DeVinney,R. and Gold,W.M. (1990). Establishment of two dog mastocytoma cell lines in continuous culture. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 3, 413-420.

Diaz,O., Berquand,A., Dubois,M., Di,A.S., Sette,C., Bourgoïn,S., Lagarde,M., Nemoz,G., and Prigent,A.F. (2002). The mechanism of docosahexaenoic acid-induced phospholipase D activation in human lymphocytes involves exclusion of the enzyme from lipid rafts. *J. Biol. Chem.* 277, 39368-39378.

Divecha,N. and Irvine,R.F. (1995). Phospholipid signaling. *Cell* 80, 269-278.

Divecha,N., Roefs,M., Halstead,J.R., D'Andrea,S., Fernandez-Borga,M., Oomen,L., Saqib,K.M., Wakelam,M.J., and D'Santos,C. (2000). Interaction of the type Iα PIPkinase with phospholipase D: a role for the local generation of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate in the regulation of PLD2 activity. *EMBO J.* 19, 5440-5449.

Du,G., Altshuler,Y.M., Vitale,N., Huang,P., Chasserot-Golaz,S., Morris,A.J., Bader,M.F., and Frohman,M.A. (2003). Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs. *J Cell Biol.* 162, 305-315.

Du,G., Huang,P., Liang,B.T., and Frohman,M.A. (2004). Phospholipase D2 localizes to the plasma membrane and regulates angiotensin II receptor endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 15, 1024-1030.

Duplus,E. and Forest,C. (2002). Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription? *Biochem. Pharmacol.* 64, 893-901.

Edwards,Y.S. and Murray,A.W. (1995). Accumulation of phosphatidylalcohol in cultured cells: use of subcellular fractionation to investigate phospholipase D activity during signal transduction. *Biochem. J* 308 (Pt 2), 473-480.

Ehehalt,R., Fullekrug,J., Pohl,J., Ring,A., Herrmann,T., and Stremmel,W. (2006). Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane--lipid rafts and fatty acid transport proteins. *Mol. Cell Biochem.* 284, 135-140.

El Marjou,M., Montalescot,V., Buzyn,A., and Geny,B. (2000). Modifications in phospholipase D activity and isoform expression occur upon maturation and differentiation in vivo and in vitro in human myeloid cells. *Leukemia* 14, 2118-2127.

Ellson,C.D., Andrews,S., Stephens,L.R., and Hawkins,P.T. (2002). The PX domain: a new phosphoinositide-binding module. *J Cell Sci.* 115, 1099-1105.

Emoto,M., Klarlund,J.K., Waters,S.B., Hu,V., Buxton,J.M., Chawla,A., and Czech,M.P. (2000). A role for phospholipase D in GLUT4 glucose transporter translocation. *J. Biol. Chem.* 275, 7144-7151.

Exton,J.H. (2002). Regulation of phospholipase D. *FEBS Lett.* 531, 58-61.

Fan,Y.Y., McMurray,D.N., Ly,L.H., and Chapkin,R.S. (2003). Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids remodel mouse T-cell lipid rafts. *J. Nutr.* 133, 1913-1920.

Farquhar,M., Soomets,U., Bates,R.L., Martin,A., Langel,U., and Howl,J. (2002). Novel mastoparan analogs induce differential secretion from mast cells. *Chem. Biol.* 9, 63-70.

Fensome,A., Cunningham,E., Prosser,S., Tan,S.K., Swigart,P., Thomas,G., Hsuan,J., and Cockcroft,S. (1996). ARF and PITP restore GTP gamma S-stimulated protein secretion from cytosol-depleted HL60 cells by promoting PIP2 synthesis. *Curr. Biol.* 6, 730-738.

Fensome,A., Cunningham,E., Troung,O., and Cockcroft,S. (1994). ARF1(2-17) does not specifically interact with ARF1-dependent pathways. Inhibition by peptide of phospholipases C beta, D and exocytosis in HL60 cells. *FEBS Lett.* 349, 34-38.

Field,K.A., Holowka,D., and Baird,B. (1997). Compartmentalized activation of the high affinity immunoglobulin E receptor within membrane domains. *J. Biol. Chem.* 272, 4276-4280.

Freyberg,Z., Bourgoïn,S., and Shields,D. (2002). Phospholipase D2 is localized to the rims of the Golgi apparatus in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 3930-3942.

Freyberg,Z., Sweeney,D., Siddhanta,A., Bourgoïn,S., Frohman,M., and Shields,D. (2001). Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 12, 943-955.

Frohman,M.A., Sung,T.C., and Morris,A.J. (1999). Mammalian phospholipase D structure and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1439, 175-186.

Fuhrmann,H., Zimmermann,A., Guck,T., and Oechtering,G. (2006). Erythrocyte and plasma fatty acid patterns in dogs with atopic dermatitis and healthy dogs in the same household. *Can. J. Vet. Res.* 70, 191-196.

Funk,C.D. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294, 1871-1875.

Gelas,P., Ribbes,G., Record,M., Terce,F., and Chap,H. (1989). Differential activation by fMet-Leu-Phe and phorbol ester of a plasma membrane phosphatidylcholine-specific phospholipase D in human neutrophil. *FEBS Lett.* 251, 213-218.

- Ghafoorunissa, Ibrahim,A., and Natarajan,S. (2005). Substituting dietary linoleic acid with alpha-linolenic acid improves insulin sensitivity in sucrose fed rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1733, 67-75.
- Gibbs,T.C. and Meier,K.E. (2000). Expression and regulation of phospholipase D isoforms in mammalian cell lines. *J Cell Physiol* 182, 77-87.
- Gilman,A.G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 615-649.
- Gluzman,Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-182.
- Gonzalez,B., Iturralde,M., Alava,M.A., Anel,A., and Pineiro,A. (2000). Metabolism of n -9, n -6 and n -3 fatty acids in hepatoma Morris 7777 cells. Preferential accumulation of linoleic acid in cardiolipin. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 62, 299-306.
- Grammatikos,S.I., Subbaiah,P.V., Victor,T.A., and Miller,W.M. (1994b). Diversity in the ability of cultured cells to elongate and desaturate essential (n-6 and n-3) fatty acids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 745, 92-105.
- Grammatikos,S.I., Subbaiah,P.V., Victor,T.A., and Miller,W.M. (1994a). Diverse effects of essential (n-6 and n-3) fatty acids on cultured cells. *Cytotechnology* 15, 31-50.
- Grenier,S., Flamand,N., Pelletier,J., Naccache,P.H., Borgeat,P., and Bourgoïn,S.G. (2003). Arachidonic acid activates phospholipase D in human neutrophils; essential role of endogenous leukotriene B4 and inhibition by adenosine A2A receptor engagement. *J. Leukoc. Biol.* 73, 530-539.
- Griffiths,G.M. (1996). Secretory lysosomes - a special mechanism of regulated secretion in haemopoietic cells. *Trends Cell Biol.* 6, 329-332.
- Gueck,T. and Fuhrmann,H. (2005). [Pathobiochemical importance of phospholipases for the release of mast cell mediators]. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 112, 404-407.
- Gueck,T., Seidel,A., Baumann,D., Meister,A., and Fuhrmann,H. (2004). Alterations of mast cell mediator production and release by gamma-linolenic and docosahexaenoic acid. *Vet. Dermatol.* 15, 309-314.
- Gueck,T., Seidel,A., and Fuhrmann,H. (2003). Effects of essential fatty acids on mediators of mast cells in culture. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 68, 317-322.

- Guild, S.B. (2001). Effects of phospholipase A(2) activating peptides upon GTP-binding protein-evoked adrenocorticotrophin secretion. *Eur. J. Pharmacol.* 424, 163-171.
- Hammond, S.M., Altshuler, Y.M., Sung, T.C., Rudge, S.A., Rose, K., Engebrecht, J., Morris, A.J., and Frohman, M.A. (1995). Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J Biol. Chem.* 270, 29640-29643.
- Hammond, S.M., Jenco, J.M., Nakashima, S., Cadwallader, K., Gu, Q., Cook, S., Nozawa, Y., Prestwich, G.D., Frohman, M.A., and Morris, A.J. (1997). Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C- α . *J. Biol. Chem.* 272, 3860-3868.
- Han, J.M., Kim, J.H., Lee, B.D., Lee, S.D., Kim, Y., Jung, Y.W., Lee, S., Cho, W., Ohba, M., Kuroki, T., Suh, P.G., and Ryu, S.H. (2002). Phosphorylation-dependent regulation of phospholipase D2 by protein kinase C delta in rat Pheochromocytoma PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 8290-8297.
- Hanahan, D.J. and Chaikoff, I.L. (1948). On the nature of the phosphorus-containing lipides of cabbage leaves and their relation to a phospholipide-splitting enzyme contained in these leaves. *J. Biol. Chem.* 172, 191-198.
- Harvey, R.G. (1999). A blinded, placebo-controlled study of the efficacy of borage seed oil and fish oil in the management of canine atopy. *Vet. Rec.* 144, 405-407.
- Heller, M. (1978). Phospholipase D. *Adv. Lipid Res.* 16, 267-326.
- Hernandez-Alcoceba, R., Saniger, L., Campos, J., Nunez, M.C., Khaless, F., Gallo, M.A., Espinosa, A., and Lacal, J.C. (1997). Choline kinase inhibitors as a novel approach for anti-proliferative drug design. *Oncogene* 15, 2289-2301.
- Higashijima, T., Burnier, J., and Ross, E.M. (1990). Regulation of Gi and Go by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. Mechanism and structural determinants of activity. *J. Biol. Chem.* 265, 14176-14186.
- Higashijima, T., Uzu, S., Nakajima, T., and Ross, E.M. (1988). Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *J. Biol. Chem.* 263, 6491-6494.

- Hilpela,P., Vartiainen,M.K., and Lappalainen,P. (2004). Regulation of the actin cytoskeleton by PI(4,5)P₂ and PI(3,4,5)P₃. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 282, 117-163.
- Hirai,Y., Kuwada,M., Yasuhara,T., Yoshida,H., and Nakajima,T. (1979a). A new mast cell degranulating peptide homologous to mastoparan in the venom of Japanese hornet (*Vespa xanthoptera*). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 27, 1945-1946.
- Hirai,Y., Yasuhara,T., Yoshida,H., Nakajima,T., Fujino,M., and Kitada,C. (1979b). A new mast cell degranulating peptide "mastoparan" in the venom of *Vespula lewisii*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 27, 1942-1944.
- Hodgkin,M.N., Clark,J.M., Rose,S., Saqib,K., and Wakelam,M.J. (1999). Characterization of the regulation of phospholipase D activity in the detergent-insoluble fraction of HL60 cells by protein kinase C and small G-proteins. *Biochem. J* 339 (Pt 1), 87-93.
- Hodgkin,M.N., Masson,M.R., Powner,D., Saqib,K.M., Ponting,C.P., and Wakelam,M.J. (2000). Phospholipase D regulation and localisation is dependent upon a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-specific PH domain. *Curr. Biol.* 10, 43-46.
- Holler,C., Freissmuth,M., and Nanoff,C. (1999). G proteins as drug targets. *Cell Mol. Life Sci.* 55, 257-270.
- Honda,A., Nogami,M., Yokozeki,T., Yamazaki,M., Nakamura,H., Watanabe,H., Kawamoto,K., Nakayama,K., Morris,A.J., Frohman,M.A., and Kanaho,Y. (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* 99, 521-532.
- Hope,H.R. and Pike,L.J. (1996). Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. *Mol. Biol. Cell* 7, 843-851.
- Hori,Y., Demura,M., Iwadate,M., Ulrich,A.S., Niidome,T., Aoyagi,H., and Asakura,T. (2001). Interaction of mastoparan with membranes studied by ¹H-NMR spectroscopy in detergent micelles and by solid-state ²H-NMR and ¹⁵N-NMR spectroscopy in oriented lipid bilayers. *Eur. J Biochem.* 268, 302-309.
- Horrobin,D.F. (2000). Essential fatty acid metabolism and its modification in atopic eczema. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 367S-372S.
- Huang,P., Altshuller,Y.M., Hou,J.C., Pessin,J.E., and Frohman,M.A. (2005). Insulin-stimulated plasma membrane fusion of Glut4 glucose transporter-containing vesicles is regulated by phospholipase D1. *Mol. Biol. Cell* 16, 2614-2623.

Hui,T.Y. and Bernlohr,D.A. (1997). Fatty acid transporters in animal cells. *Front Biosci.* 2, d222-d231.

Inagaki,K., Aki,T., Fukuda,Y., Kawamoto,S., Shigeta,S., Ono,K., and Suzuki,O. (2002). Identification and expression of a rat fatty acid elongase involved in the biosynthesis of C18 fatty acids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 613-621.

Innis,S.M., Sprecher,H., Hachey,D., Edmond,J., and Anderson,R.E. (1999). Neonatal polyunsaturated fatty acid metabolism. *Lipids* 34, 139-149.

Ishihara,K., Murata,M., Kaneniwa,M., Saito,H., Shinohara,K., Maeda-Yamamoto,M., Kawasaki,K., and Ooizumi,T. (1998). Effect of tetracosahexaenoic acid on the content and release of histamine, and eicosanoid production in MC/9 mouse mast cell. *Lipids* 33, 1107-1114.

Iturralde,M., Gonzalez,B., and Pineiro,A. (1990). Linoleate and linolenate desaturation by rat hepatoma cells. *Biochem. Int.* 20, 37-43.

Iyer,S.S. and Kusner,D.J. (1999). Association of phospholipase D activity with the detergent-insoluble cytoskeleton of U937 promonocytic leukocytes. *J Biol. Chem.* 274, 2350-2359.

Jacob,R. and Naim,H.Y. (2001). Apical membrane proteins are transported in distinct vesicular carriers. *Curr. Biol.* 11, 1444-1450.

Jakobsson,A., Westerberg,R., and Jakobsson,A. (2006). Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog. Lipid Res.* 45, 237-249.

Jenkins,G.H., Fiset,P.L., and Anderson,R.A. (1994). Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms are specifically stimulated by phosphatidic acid. *J Biol. Chem.* 269, 11547-11554.

Jenkins,G.M. and Frohman,M.A. (2005). Phospholipase D: a lipid centric review. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 2305-2316.

Jiang,Y.J., Hatch,G.M., Mymin,D., Dembinski,T., Kroeger,E.A., and Choy,P.C. (2001). Modulation of cytosolic phospholipase A(2) by PPAR activators in human preadipocytes. *J Lipid Res.* 42, 716-724.

Johnson,M.M., Swan,D.D., Surette,M.E., Stegner,J., Chilton,T., Fonteh,A.N., and Chilton,F.H. (1997). Dietary supplementation with gamma-linolenic acid alters fatty acid content and eicosanoid production in healthy humans. *J Nutr.* 127, 1435-1444.

- Jones,D., Morgan,C., and Cockcroft,S. (1999). Phospholipase D and membrane traffic. Potential roles in regulated exocytosis, membrane delivery and vesicle budding. *Biochim. Biophys. Acta* 1439, 229-244.
- Jump,D.B. (2002b). The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Biol. Chem.* 277, 8755-8758.
- Jump,D.B. (2002a). Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr. Opin. Lipidol.* 13, 155-164.
- Jump,D.B., Botolin,D., Wang,Y., Xu,J., Christian,B., and Demeure,O. (2005). Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *J. Nutr.* 135, 2503-2506.
- Jump,D.B., Clarke,S.D., MacDougald,O., and Thelen,A. (1993). Polyunsaturated fatty acids inhibit S14 gene transcription in rat liver and cultured hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 8454-8458.
- Jump,D.B., Clarke,S.D., Thelen,A., and Liimatta,M. (1994). Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res.* 35, 1076-1084.
- Jump,D.B., Thelen,A., and Mater,M. (1999). Dietary polyunsaturated fatty acids and hepatic gene expression. *Lipids* 34 *Suppl*, S209-S212.
- Kanfer,J.N. (1980). The base exchange enzymes and phospholipase D of mammalian tissue. *Can. J. Biochem.* 58, 1370-1380.
- Kasai,T., Ohguchi,K., Nakashima,S., Ito,Y., Naganawa,T., Kondo,N., and Nozawa,Y. (1998). Increased activity of oleate-dependent type phospholipase D during actinomycin D-induced apoptosis in Jurkat T cells. *J. Immunol.* 161, 6469-6474.
- Katayama,K., Kodaki,T., Nagamachi,Y., and Yamashita,S. (1998). Cloning, differential regulation and tissue distribution of alternatively spliced isoforms of ADP-ribosylation-factor-dependent phospholipase D from rat liver. *Biochem. J.* 329 (Pt 3), 647-652.
- Kawasaki,M., Toyoda,M., Teshima,R., Sawada,J., and Saito,Y. (1994). Effect of alpha-linolenic acid on the metabolism of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids and histamine release in RBL-2H3 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 1321-1325.

- Kelley,E.E., Buettner,G.R., and Burns,C.P. (1995). Relative alpha-tocopherol deficiency in cultured cells: free radical-mediated lipid peroxidation, lipid oxidizability, and cellular polyunsaturated fatty acid content. *Arch. Biochem. Biophys.* **319**, 102-109.
- Kim,H., Lee,J., Kim,S., Shin,M.K., Min,d.S., and Shin,T. (2007). Differential expression of phospholipases D1 and D2 in mouse tissues. *Cell Biol. Int.* **31**, 148-155.
- Kim,J.H., Han,J.M., Lee,S., Kim,Y., Lee,T.G., Park,J.B., Lee,S.D., Suh,P.G., and Ryu,S.H. (1999a). Phospholipase D1 in caveolae: regulation by protein kinase Calpha and caveolin-1. *Biochemistry* **38**, 3763-3769.
- Kim,J.H., Kim,Y., Lee,S.D., Lopez,I., Arnold,R.S., Lambeth,J.D., Suh,P.G., and Ryu,S.H. (1999b). Selective activation of phospholipase D2 by unsaturated fatty acid. *FEBS Lett.* **454**, 42-46.
- Kim,Y., Han,J.M., Park,J.B., Lee,S.D., Oh,Y.S., Chung,C., Lee,T.G., Kim,J.H., Park,S.K., Yoo,J.S., Suh,P.G., and Ryu,S.H. (1999c). Phosphorylation and activation of phospholipase D1 by protein kinase C in vivo: determination of multiple phosphorylation sites. *Biochemistry* **38**, 10344-10351.
- Kim,Y., Kim,J.E., Lee,S.D., Lee,T.G., Kim,J.H., Park,J.B., Han,J.M., Jang,S.K., Suh,P.G., and Ryu,S.H. (1999d). Phospholipase D1 is located and activated by protein kinase C alpha in the plasma membrane in 3Y1 fibroblast cell. *Biochim. Biophys. Acta* **1436**, 319-330.
- Kinsella,J.E., Lokesh,B., Broughton,S., and Whelan,J. (1990). Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoids: potential effects on the modulation of inflammatory and immune cells: an overview. *Nutrition* **6**, 24-44.
- Kodaki,T. and Yamashita,S. (1997). Cloning, expression, and characterization of a novel phospholipase D complementary DNA from rat brain. *J. Biol. Chem.* **272**, 11408-11413.
- Komati,H., Naro,F., Mebarek,S., De,A., V, Adamo,S., Lagarde,M., Prigent,A.F., and Nemoz,G. (2005). Phospholipase D is involved in myogenic differentiation through remodeling of actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1232-1244.
- Koonen,D.P., Glatz,J.F., Bonen,A., and Luiken,J.J. (2005). Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **1736**, 163-180.
- Koonin,E.V. (1996). A duplicated catalytic motif in a new superfamily of phosphohydrolases and phospholipid synthases that includes poxvirus envelope proteins. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 242-243.

- Ktistakis,N.T., Brown,H.A., Sternweis,P.C., and Roth,M.G. (1995). Phospholipase D is present on Golgi-enriched membranes and its activation by ADP ribosylation factor is sensitive to brefeldin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 4952-4956.
- Ktistakis,N.T., Brown,H.A., Waters,M.G., Sternweis,P.C., and Roth,M.G. (1996). Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles. *J Cell Biol.* 134, 295-306.
- Kurihara,H., Kitajima,K., Senda,T., Fujita,H., and Nakajima,T. (1986). Multigranular exocytosis induced by phospholipase A2-activators, melittin and mastoparan, in rat anterior pituitary cells. *Cell Tissue Res.* 243, 311-316.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lai,R., Liu,H., Lee,W.H., and Zhang,Y. (2002a). A novel proline rich bombesin-related peptide (PR-bombesin) from toad *Bombina maxima*. *Peptides* 23, 437-442.
- Lai,R., Zheng,Y.T., Shen,J.H., Liu,G.J., Liu,H., Lee,W.H., Tang,S.Z., and Zhang,Y. (2002b). Antimicrobial peptides from skin secretions of Chinese red belly toad *Bombina maxima*. *Peptides* 23, 427-435.
- Lauritzen,L., Hansen,H.S., Jorgensen,M.H., and Michaelsen,K.F. (2001). The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog. Lipid Res.* 40, 1-94.
- Lazarus,S.C., DeVinney,R., McCabe,L.J., Finkbeiner,W.E., Elias,D.J., and Gold,W.M. (1986). Isolated canine mastocytoma cells: propagation and characterization of two cell lines. *Am. J Physiol* 251, C935-C944.
- Lee,S., Park,J.B., Kim,J.H., Kim,Y., Kim,J.H., Shin,K.J., Lee,J.S., Ha,S.H., Suh,P.G., and Ryu,S.H. (2001). Actin directly interacts with phospholipase D, inhibiting its activity. *J. Biol. Chem.* 276, 28252-28260.
- Lee,S.Y., Park,N.G., and Choi,M.U. (1998). Effects of mastoparan B and its analogs on the phospholipase D activity in L1210 cells. *FEBS Lett.* 432, 50-54.
- Leiros,I., Secundo,F., Zambonelli,C., Servi,S., and Hough,E. (2000). The first crystal structure of a phospholipase D. *Structure.* 8, 655-667.

- Leonard,A.E., Pereira,S.L., Sprecher,H., and Huang,Y.S. (2004). Elongation of long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.* **43**, 36-54.
- Li,Q., Tan,L., Wang,C., Li,N., Li,Y., Xu,G., and Li,J. (2006). Polyunsaturated eicosapentaenoic acid changes lipid composition in lipid rafts. *Eur. J Nutr.* **45**, 144-151.
- Li,Z., Okamoto,K.I., Hayashi,Y., and Sheng,M. (2004). The Importance of Dendritic Mitochondria in the Morphogenesis and Plasticity of Spines and Synapses. *Cell* **119**, 873-887.
- Liscovitch,M., Chalifa,V., Pertile,P., Chen,C.S., and Cantley,L.C. (1994). Novel function of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D. *J Biol. Chem.* **269**, 21403-21406.
- Liscovitch,M., Czarny,M., Fiucci,G., Lavie,Y., and Tang,X. (1999). Localization and possible functions of phospholipase D isozymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1439**, 245-263.
- Liscovitch,M., Czarny,M., Fiucci,G., and Tang,X. (2000). Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem. J* **345 Pt 3**, 401-415.
- Liu,S.Y., Tappia,P.S., Dai,J., Williams,S.A., and Panagia,V. (1998). Phospholipase A2-mediated activation of phospholipase D in rat heart sarcolemma. *J. Mol. Cell Cardiol.* **30**, 1203-1214.
- Lopez,I., Arnold,R.S., and Lambeth,J.D. (1998). Cloning and initial characterization of a human phospholipase D2 (hPLD2). ADP-ribosylation factor regulates hPLD2. *J Biol. Chem.* **273**, 12846-12852.
- Lucocq,J., Manifava,M., Bi,K., Roth,M.G., and Ktistakis,N.T. (2001). Immunolocalisation of phospholipase D1 on tubular vesicular membranes of endocytic and secretory origin. *Eur. J. Cell Biol.* **80**, 508-520.
- Ma,D.W., Seo,J., Switzer,K.C., Fan,Y.Y., McMurray,D.N., Lupton,J.R., and Chapkin,R.S. (2004). n-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research. *J. Nutr. Biochem.* **15**, 700-706.
- Madaule,P. and Axel,R. (1985). A novel ras-related gene family. *Cell* **41**, 31-40.
- Maffucci,T. and Falasca,M. (2001). Specificity in pleckstrin homology (PH) domain membrane targeting: a role for a phosphoinositide-protein co-operative mechanism. *FEBS Lett.* **506**, 173-179.

Malencik,D.A. and Anderson,S.R. (1984). Peptide binding by calmodulin and its proteolytic fragments and by troponin C. *Biochemistry* 23, 2420-2428.

Manifava,M., Sugars,J., and Ktistakis,N.T. (1999). Modification of catalytically active phospholipase D1 with fatty acid in vivo. *J Biol. Chem.* 274, 1072-1077.

Manku,M.S., Horrobin,D.F., Morse,N., Kyte,V., Jenkins,K., Wright,S., and Burton,J.L. (1982). Reduced levels of prostaglandin precursors in the blood of atopic patients: defective delta-6-desaturase function as a biochemical basis for atopy. *Prostaglandins Leukot. Med.* 9, 615-628.

Manku,M.S., Horrobin,D.F., Morse,N.L., Wright,S., and Burton,J.L. (1984). Essential fatty acids in the plasma phospholipids of patients with atopic eczema. *Br. J Dermatol* 110, 643-648.

Massenburg,D., Han,J.S., Liyanage,M., Patton,W.A., Rhee,S.G., Moss,J., and Vaughan,M. (1994). Activation of rat brain phospholipase D by ADP-ribosylation factors 1,5, and 6: separation of ADP-ribosylation factor-dependent and oleate-dependent enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 11718-11722.

McCutchan,J.H. and Pagano,J.S. (1968). Enhancement of the infectivity of simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran. *J Natl. Cancer Inst.* 41, 351-357.

McDermott,M., Wakelam,M.J., and Morris,A.J. (2004). Phospholipase D. *Biochem. Cell Biol.* 82, 225-253.

Meier,K.E., Gibbs,T.C., Knoepp,S.M., and Ella,K.M. (1999). Expression of phospholipase D isoforms in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1439, 199-213.

Meskini,N., Zakaroff,A., Joulain,C., Nemoz,G., Lagarde,M., and Prigent,A.F. (1995). Triggering of a phospholipase D pathway upon mitogenic stimulation of human peripheral blood mononuclear cells enriched with 12(S)-hydroxyicosatetraenoic acid. *Eur. J. Biochem.* 233, 907-915.

Mizuno,K., Nakahata,N., and Ohizumi,Y. (1998). Characterization of mastoparan-induced histamine release from RBL-2H3 cells. *Toxicon* 36, 447-456.

Mohrhauer,H. and Holman,R.T. (1963). Effect of Linolenic Acid Upon the Metabolism of Linoleic Acid. *Journal of Nutrition* 81, 67-74.

- Morgan,C.P., Sengelov,H., Whatmore,J., Borregaard,N., and Cockcroft,S. (1997). ADP-ribosylation-factor-regulated phospholipase D activity localizes to secretory vesicles and mobilizes to the plasma membrane following N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine stimulation of human neutrophils. *Biochem. J* 325 (Pt 3), 581-585.
- Moritz,A., De Graan,P.N., Gispen,W.H., and Wirtz,K.W. (1992). Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase. *J. Biol. Chem.* 267, 7207-7210.
- Morris,A.J., Engebrecht,J., and Frohman,M.A. (1996). Structure and regulation of phospholipase D. *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 182-185.
- Morris,A.J., Frohman,M.A., and Engebrecht,J. (1997). Measurement of phospholipase D activity. *Anal. Biochem.* 252, 1-9.
- Moss,J. and Vaughan,M. (1995). Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *J Biol. Chem.* 270, 12327-12330.
- Munck,A., Bohm,C., Seibel,N.M., Hashemol,H.Z., and Hampe,W. (2005). Hu-K4 is a ubiquitously expressed type 2 transmembrane protein associated with the endoplasmic reticulum. *FEBS J* 272, 1718-1726.
- Murase,T. and Iio,T. (2002). Static and kinetic studies of complex formations between calmodulin and mastoparanX. *Biochemistry* 41, 1618-1629.
- Murthy,S.N., Chung,P.H., Lin,L., and Lomasney,J.W. (2006). Activation of phospholipase Cepsilon by free fatty acids and cross talk with phospholipase D and phospholipase A2. *Biochemistry* 45, 10987-10997.
- Nishizuka,Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607-614.
- Noh,D.Y., Ahn,S.J., Lee,R.A., Park,I.A., Kim,J.H., Suh,P.G., Ryu,S.H., Lee,K.H., and Han,J.S. (2000). Overexpression of phospholipase D1 in human breast cancer tissues. *Cancer Lett.* 161, 207-214.
- Ohguchi,K., Nakashima,S., and Nozawa,Y. (1999). Phospholipase D development during differentiation of human promyelocytic leukemic HL60 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1439, 215-227.

Olivry,T., Marsella,R., and Hillier,A. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIII): are essential fatty acids effective? *Vet. Immunol. Immunopathol.* **81**, 347-362.

Oliwiecki,S., Burton,J.L., Elles,K., and Horrobin,D.F. (1991). Levels of essential and other fatty acids in plasma and red cell phospholipids from normal controls and patients with atopic eczema. *Acta Derm. Venereol.* **71**, 224-228.

Oude Weernink,P.A., Lopez,d.J., and Schmidt,M. (2007). Phospholipase D signaling: orchestration by PIP(2) and small GTPases. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **374**, 399-411.

Pan,D.A., Mater,M.K., Thelen,A.P., Peters,J.M., Gonzalez,F.J., and Jump,D.B. (2000). Evidence against the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) as the mediator for polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic L-pyruvate kinase gene transcription. *J Lipid Res.* **41**, 742-751.

Park,J.B., Kim,J.H., Kim,Y., Ha,S.H., Yoo,J.S., Du,G., Frohman,M.A., Suh,P.G., and Ryu,S.H. (2000). Cardiac phospholipase D2 localizes to sarcolemmal membranes and is inhibited by alpha-actinin in an ADP-ribosylation factor-reversible manner. *J. Biol. Chem.* **275**, 21295-21301.

Park,S.K., Provost,J.J., Bae,C.D., Ho,W.T., and Exton,J.H. (1997). Cloning and characterization of phospholipase D from rat brain. *J. Biol. Chem.* **272**, 29263-29271.

Pawar,A. and Jump,D.B. (2003). Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in rat primary hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **278**, 35931-35939.

Pereira,S.L., Leonard,A.E., and Mukerji,P. (2003). Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **68**, 97-106.

Pertile,P., Liscovitch,M., Chalifa,V., and Cantley,L.C. (1995). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis is required for activation of phospholipase D in U937 cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 5130-5135.

Pike,L.J. and Casey,L. (1996). Localization and turnover of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolin-enriched membrane domains. *J Biol. Chem.* **271**, 26453-26456.

- Pike, L.J. and Miller, J.M. (1998). Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* 273, 22298-22304.
- Ponting, C.P. (1996). Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? *Protein Sci.* 5, 2353-2357.
- Ponting, C.P. and Kerr, I.D. (1996). A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Sci.* 5, 914-922.
- Powner, D.J., Hodgkin, M.N., and Wakelam, M.J. (2002). Antigen-stimulated activation of phospholipase D1b by Rac1, ARF6, and PKC α in RBL-2H3 cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 1252-1262.
- Powner, D.J. and Wakelam, M.J. (2002). The regulation of phospholipase D by inositol phospholipids and small GTPases. *FEBS Lett.* 531, 62-64.
- Ren, B., Thelen, A.P., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., and Jump, D.B. (1997). Polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic fatty acid synthase and S14 gene expression does not require peroxisome proliferator-activated receptor α . *J Biol. Chem.* 272, 26827-26832.
- Retterstol, K., Haugen, T.B., and Christophersen, B.O. (2000). The pathway from arachidonic to docosapentaenoic acid (20:4n-6 to 22:5n-6) and from eicosapentaenoic to docosahexaenoic acid (20:5n-3 to 22:6n-3) studied in testicular cells from immature rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1483, 119-131.
- Rhee, S.G. and Choi, K.D. (1992). Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 267, 12393-12396.
- Rose, K., Rudge, S.A., Frohman, M.A., Morris, A.J., and Engebrecht, J. (1995). Phospholipase D signaling is essential for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 12151-12155.
- Rosenthal, M.D. (1987). Fatty acid metabolism of isolated mammalian cells. *Prog. Lipid Res.* 26, 87-124.
- Rosenthal, M.D., Garcia, M.C., Jones, M.R., and Sprecher, H. (1991). Retroconversion and Δ 4 desaturation of docosatetraenoate (22:4(n-6)) and docosapentaenoate (22:5(n-3)) by human cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 1083, 29-36.

Rosenthal,M.D. and Whitehurst,M.C. (1983). Fatty acyl delta 6 desaturation activity of cultured human endothelial cells. Modulation by fetal bovine serum. *Biochim. Biophys. Acta* 750, 490-496.

Russo,M.A., Quartacci,M.F., Izzo,R., Belligno,A., and Navari-Izzo,F. (2007). Long- and short-term phosphate deprivation in bean roots: plasma membrane lipid alterations and transient stimulation of phospholipases. *Phytochemistry* 68, 1564-1571.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Manniatis, T. Spectrophotometric Determination of the Amount of DNA or RNA. Schenk, H. E. A., Herrmann, R., Jeon, K. W., Müller, N. E., and Schwemmler, W. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 1989. Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA.

Sardesai,V.M. (1992a). Nutritional role of polyunsaturated fatty acids. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 3, 154-166.

Sardesai,V.M. (1992b). The essential fatty acids. *Nutr. Clin. Pract.* 7, 179-186.

Sarri,E., Pardo,R., Fensome-Green,A., and Cockcroft,S. (2003). Endogenous phospholipase D2 localizes to the plasma membrane of RBL-2H3 mast cells and can be distinguished from ADP ribosylation factor-stimulated phospholipase D1 activity by its specific sensitivity to oleic acid. *Biochem. J.* 369, 319-329.

Scarff,D.H. and Lloyd,D.H. (1992). Double blind, placebo-controlled, crossover study of evening primrose oil in the treatment of canine atopy. *Vet. Rec.* 131, 97-99.

Schafer,L. and Kragballe,K. (1991). Abnormalities in Epidermal Lipid Metabolism in Patients with Atopic Dermatitis. *J Investig Dermatol* 96, 10-15.

Schmidt,M., Rumenapp,U., Bienek,C., Keller,J., Von Eichel-Streiber,C., and Jakobs,K.H. (1996a). Inhibition of receptor signaling to phospholipase D by *Clostridium difficile* toxin B. Role of Rho proteins. *J. Biol. Chem.* 271, 2422-2426.

Schmidt,M., Rumenapp,U., Nehls,C., Ott,S., Keller,J., Von Eichel-Streiber,C., and Jakobs,K.H. (1996b). Restoration of *Clostridium difficile* toxin-B-inhibited phospholipase D by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Eur. J. Biochem.* 240, 707-712.

Schmitz,G. and Ecker,J. (2008). The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 47, 147-155.

Schroeder,R., London,E., and Brown,D. (1994). Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 12130-12134.

Schurer,N.Y., Rippke,F., Vogelsang,K., Schliep,V., and Ruzicka,T. (1999). Fatty acid uptake by cultured human keratinocytes grown in medium deficient in or supplemented with essential fatty acids. *Arch. Dermatol Res.* *291*, 47-53.

Sciorra,V.A., Rudge,S.A., Prestwich,G.D., Frohman,M.A., Engebrecht,J., and Morris,A.J. (1999). Identification of a phosphoinositide binding motif that mediates activation of mammalian and yeast phospholipase D isoenzymes. *EMBO J* *18*, 5911-5921.

Scott,D.W. and Miller,W.H., Jr. (1990). Nonsteroidal management of canine pruritus: chlorpheniramine and a fatty acid supplement (DVM Derm Caps) in combination, and the fatty acid supplement at twice the manufacturer's recommended dosage. *Cornell Vet.* *80*, 381-387.

Scott,D.W., Miller,W.H., Jr., Reinhart,G.A., Mohammed,H.O., and Bagladi,M.S. (1997). Effect of an omega-3/omega-6 fatty acid-containing commercial lamb and rice diet on pruritus in atopic dogs: results of a single-blinded study. *Can. J Vet. Res.* *61*, 145-153.

Seidel,A., Gueck,T., and Fuhrmann,H. (2005). The Influence of long-chain polyunsaturated fatty acids on total lipid fatty acid composition of a canine mastocytoma cell line. *J. Vet. Med. A Physiol Pathol. Clin. Med.* *52*, 219-224.

Shome,K., Nie,Y., and Romero,G. (1998). ADP-ribosylation factor proteins mediate agonist-induced activation of phospholipase D. *J Biol. Chem.* *273*, 30836-30841.

Siddiqi,A.R., Srajer,G.E., and Leslie,C.C. (2000). Regulation of human PLD1 and PLD2 by calcium and protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta* *1497*, 103-114.

Simopoulos,A.P. (2002). Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J. Am. Coll. Nutr.* *21*, 495-505.

Slaaby,R., Du,G., Altshuller,Y.M., Frohman,M.A., and Seedorf,K. (2000). Insulin-induced phospholipase D1 and phospholipase D2 activity in human embryonic kidney-293 cells mediated by the phospholipase C gamma and protein kinase C alpha signalling cascade. *Biochem. J* *351 Pt 3*, 613-619.

Song,D.L., Chang,G.D., Ho,C.L., and Chang,C.H. (1993). Structural requirements of mastoparan for activation of membrane-bound guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* 247, 283-288.

Sonnichsen,M. and Muller,B.W. (1999). A rapid and quantitative method for total fatty acid analysis of fungi and other biological samples. *Lipids* 34, 1347-1349.

Spector,A.A., Mathur,S.N., Kaduce,T.L., and Hyman,B.T. (1980). Lipid nutrition and metabolism of cultured mammalian cells. *Prog. Lipid Res.* 19, 155-186.

Spector,A.A. and Yorek,M.A. (1985). Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res.* 26, 1015-1035.

Sprecher,H. (1981). Biochemistry of essential fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 20, 13-22.

Sprecher,H., Voss,A.C., Careaga,M., and Haggiagiapiou,C. (1987). Interrelationships between poly unsaturated fatty acids and membrane lipid synthesis. In *Polyunsaturated Fatty Acids and Eicosanoids*, Lands,W.E.M.), pp. 154-168.

Steed,P.M., Clark,K.L., Boyar,W.C., and Lasala,D.J. (1998). Characterization of human PLD2 and the analysis of PLD isoform splice variants. *FASEB J* 12, 1309-1317.

Stulnig,T.M. (2003). Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: mechanisms and effects. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 132, 310-321.

Stulnig,T.M., Berger,M., Sigmund,T., Raederstorff,D., Stockinger,H., and Waldhausl,W. (1998). Polyunsaturated fatty acids inhibit T cell signal transduction by modification of detergent-insoluble membrane domains. *J. Cell Biol.* 143, 637-644.

Stulnig,T.M., Huber,J., Leitinger,N., Imre,E.M., Angelisova,P., Nowotny,P., and Waldhausl,W. (2001). Polyunsaturated eicosapentaenoic acid displaces proteins from membrane rafts by altering raft lipid composition. *J Biol. Chem.* 276, 37335-37340.

Sugama,J., Ohkubo,S., Atsumi,M., and Nakahata,N. (2005). Mastoparan changes the cellular localization of Galphaq/11 and Gbeta through its binding to ganglioside in lipid rafts. *Mol. Pharmacol.* 68, 1466-1474.

Sugars,J.M., Celtek,S., Manifava,M., Coadwell,J., and Ktistakis,N.T. (1999). Fatty acylation of phospholipase D1 on cysteine residues 240 and 241 determines localization on intracellular membranes. *J Biol. Chem.* 274, 30023-30027.

- Sugars, J.M., Cellek, S., Manifava, M., Coadwell, J., and Ktistakis, N.T. (2002). Hierarchy of membrane-targeting signals of phospholipase D1 involving lipid modification of a pleckstrin homology domain. *J. Biol. Chem.* 277, 29152-29161.
- Sukumar, M. and Higashijima, T. (1992). G protein-bound conformation of mastoparan-X, a receptor-mimetic peptide. *J Biol. Chem.* 267, 21421-21424.
- Sung, T.C., Altshuler, Y.M., Morris, A.J., and Frohman, M.A. (1999a). Molecular analysis of mammalian phospholipase D2. *J Biol. Chem.* 274, 494-502.
- Sung, T.C., Roper, R.L., Zhang, Y., Rudge, S.A., Temel, R., Hammond, S.M., Morris, A.J., Moss, B., Engebrecht, J., and Frohman, M.A. (1997). Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *EMBO J.* 16, 4519-4530.
- Sung, T.C., Zhang, Y., Morris, A.J., and Frohman, M.A. (1999b). Structural analysis of human phospholipase D1. *J Biol. Chem.* 274, 3659-3666.
- Tiwari, R.K., Clandinin, M.T., and Cinader, B. (1987). Effect of high polyunsaturated fat diets on the composition of B cell and T cell membrane lipids. *Nutr. Res.* 7, 489-498.
- Tocher, D.R. and Dick, J.R. (2001). Effects of essential fatty acid deficiency and supplementation with docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) on cellular fatty acid compositions and fatty acyl desaturation in a cell culture model. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 64, 11-22.
- Toda, K., Nogami, M., Murakami, K., Kanaho, Y., and Nakayama, K. (1999). Colocalization of phospholipase D1 and GTP-binding-defective mutant of ADP-ribosylation factor 6 to endosomes and lysosomes. *FEBS Lett.* 442, 221-225.
- Todokoro, Y., Yumen, I., Fukushima, K., Kang, S.W., Park, J.S., Kohno, T., Wakamatsu, K., Akutsu, H., and Fujiwara, T. (2006). Structure of tightly membrane-bound mastoparan-X, a G-protein-activating peptide, determined by solid-state NMR. *Biophys. J.* 91, 1368-1379.
- Uchida, N., Okamura, S., and Kuwano, H. (1999). Phospholipase D activity in human gastric carcinoma. *Anticancer Res.* 19, 671-675.
- Uchida, N., Okamura, S., Nagamachi, Y., and Yamashita, S. (1997). Increased phospholipase D activity in human breast cancer. *J Cancer Res. Clin. Oncol.* 123, 280-285.

Umebayashi,K. (2003). The roles of ubiquitin and lipids in protein sorting along the endocytic pathway. *Cell Struct. Funct.* 28, 443-453.

Wallis,J.G. and Browse,J. (1999). The Delta8-desaturase of *Euglena gracilis*: an alternate pathway for synthesis of 20-carbon polyunsaturated fatty acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 365, 307-316.

Wang,X., Xu,L., and Zheng,L. (1994). Cloning and expression of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D from *Ricinus communis* L. *J Biol. Chem.* 269, 20312-20317.

Wang,Y. and Oram,J.F. (2005). Unsaturated fatty acids phosphorylate and destabilize ABCA1 through a phospholipase D2 pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 35896-35903.

Watson,T.D. (1998). Diet and skin disease in dogs and cats. *J. Nutr.* 128, 2783S-2789S.

Way,G., O'Lunaigh,N., and Cockcroft,S. (2000). Activation of exocytosis by cross-linking of the IgE receptor is dependent on ADP-ribosylation factor 1-regulated phospholipase D in RBL-2H3 mast cells: evidence that the mechanism of activation is via regulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Biochem. J* 346 Pt 1, 63-70.

Whatmore,J., Morgan,C.P., Cunningham,E., Collison,K.S., Willison,K.R., and Cockcroft,S. (1996). ADP-ribosylation factor 1-regulated phospholipase D activity is localized at the plasma membrane and intracellular organelles in HL60 cells. *Biochem. J* 320 (Pt 3), 785-794.

Xie,Z., Ho,W.T., and Exton,J.H. (2000). Association of the N- and C-terminal domains of phospholipase D. Contribution of the conserved HKD motifs to the interaction and the requirement of the association for Ser/Thr phosphorylation of the enzyme. *J Biol. Chem.* 275, 24962-24969.

Xie,Z., Ho,W.T., and Exton,J.H. (2001). Requirements and effects of palmitoylation of rat PLD1. *J Biol. Chem.* 276, 9383-9391.

Xu,Y., Seet,L.F., Hanson,B., and Hong,W. (2001). The Phox homology (PX) domain, a new player in phosphoinositide signalling. *Biochem. J* 360, 513-530.

Yamazaki,M., Zhang,Y., Watanabe,H., Yokozeki,T., Ohno,S., Kaibuchi,K., Shibata,H., Mukai,H., Ono,Y., Frohman,M.A., and Kanaho,Y. (1999). Interaction of the small G protein RhoA with the C terminus of human phospholipase D1. *J Biol. Chem.* 274, 6035-6038.

Yin,H.L. and Janmey,P.A. (2003). Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Physiol* 65, 761-789.

Yoshida,M., Okamura,S., Kodaki,T., Mori,M., and Yamashita,S. (1998). Enhanced levels of oleate-dependent and Arf-dependent phospholipase D isoforms in experimental colon cancer. *Oncol. Res.* 10, 399-406.

Zhao,Y., Ehara,H., Akao,Y., Shamoto,M., Nakagawa,Y., Banno,Y., Deguchi,T., Ohishi,N., Yagi,K., and Nozawa,Y. (2000). Increased activity and intranuclear expression of phospholipase D2 in human renal cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 140-143.

8 Lebenslauf

Anja Gemeinhardt

geb. Schneider

Familienstand: verheiratet

07.05.1978	geboren in Leipzig
1984 – 1985	Heinrich-Heine-Schule Leipzig
1985 – 1992	27. Schule Leipzig
1992 – 1994	Gymnasium in Schulpforte (Sachsen-Anhalt)
1994 – 1997	Humboldt-Gymnasium Leipzig
	– Schulabschluss im Juli 1997 mit dem Abitur
1997 – 2003	Studium an der Universität Leipzig im Diplomstudiengang Biologie
	– Schwerpunkte: Spezielle Zoologie, Genetik, Mikrobiologie, Immunbiologie, Molekulare Medizin und Virologie
	– Im 5. Semester Besuch der Friedrich-Schiller-Universität Jena als Zweithörerin im Fach Mikrobiologie
	– Projektarbeit im Fach Spezielle Zoologie bei Prof. Martin Schlegel („ <i>Erste Analysen über das Histon H3/H4-Gencluster der Landschnecken Azeca goodalli [Cochlicopidae] und Vertigo antivertigo [Vertiginoidea]</i> “)
	– Diplomarbeit im Fach Mikrobiologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena bei Prof. Johannes Wöstemeyer („ <i>Entwicklung und Validierung generell anwendbarer Primer-Paare für die Amplifikation von Cdc2/Cdc28-Genen bei Pilzen [Eumycota]</i> “)
	– Betreuung der Mikrobiologischen Grundpraktika an der Universität Leipzig und der Friedrich-Schiller-Universität Jena
	– Abschluss des Studiums als Diplom-Biologin im April 2003
2003	Beginn der Promotion an der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Prof. Dr. Johannes Wöstemeyer) und der Universität Leipzig (Prof. Dr. Herbert Fuhrmann)
2003 – 2004	Wissenschaftliche Hilfskraft am Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Leipzig
2004 – 2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Leipzig
Seit 01/2008	Mitarbeiterin bei der mibe-GmbH Arzneimittel im Bereich Arzneimittelzulassung

9 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel angewendet habe.

Leipzig, 03.Juli 2008

Anja Gemeinhardt

10 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Anja Gemeinhardt, geboren am 07.05.1978, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist. Die vorliegende Dissertation „Die Wirkung essentieller Fettsäuren auf die Aktivität und den intrazellulären Transport der Phospholipase D in COS-1 und C2-Zellen“ wurde von mir selbständig angefertigt und es wurden keine anderen außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Es wurden von mir keine geldwerten Leistungen erbracht, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe die Dissertation am Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Leipzig angefertigt. Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

Leipzig, 03. Juli 2008

Anja Gemeinhardt

11 Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Herbert Fuhrmann danke ich für die Bereitstellung des Themas, die schnellen Korrekturen des Manuskripts und die freundliche Betreuung während der letzten fünf Jahre. Allen Mitarbeitern des Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institutes der Universität Leipzig danke ich für die unvergessliche Zeit, die freundliche Unterstützung bei der Arbeit und das traumhafte Klima im Institut. Herrn PD Dr. Thomas Gück danke ich für die vielen Tipps und Diskussionen rund um Wissenschaft, Forschung und Lehre, seine humorvolle Art und die ein oder andere Vertretung im Praktikum. Mein besonderer Dank gilt Andrea Büchner, Gabriele Dobeleit und Gerald Vallentin, nicht nur für Ihre fürsorgliche Betreuung rund um Zellkultur und Fettsäuren, sondern auch für die vielen unvergesslichen Momente zwischendurch. Vielen Dank auch an Renate Pohle für die großartige Unterstützung bei der Dünnschichtchromatographie. Bernd Walloschke, Sandra Schmutzler, Michaela Feige und Philipp Kaiser danke ich für die vielen inspirativen „Brainstormings“ und ihre wundervolle Freundschaft. Bernd danke ich weiterhin für die unzähligen traumhaften, meist computertechnischen „Supports“. Sandra danke ich außerdem für die unzähligen Abende, die wir zusammen schreibend im Institut verbrachten und ihre hilfreiche „Korrekturlesefunktion“.

Herrn Prof. Dr. Hassan Naim danke ich für die Möglichkeit, einen großen Teil dieser Arbeit an seinem Institut durchführen zu können und für die freundliche Betreuung während meiner Zeit in Hannover. Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Marwan Alfalah, der mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Manchmal hättest Du mich fast zur Verzweiflung gebracht, aber ich danke Dir für alles, was Du in den letzten Jahren für mich getan hast. Allen anderen Mitarbeitern, Doktoranden und Diplomanden der Physiologischen Chemie der Tierärztlichen Hochschule Hannover danke ich für ihre freundliche Aufnahme, ihre großartige Unterstützung und das geduldige Ertragen meiner Putzanfälle. Bei Dr. Nicola Beindorff und Wilma bedanke ich mich sehr herzlich für die liebevolle Aufnahme und Unterbringung während meiner Hannover-Aufenthalte.

Herrn Prof. Dr. Johannes Wöstemeyer danke ich für das spontane Angebot, die Betreuung dieser Arbeit an der Universität Jena zu übernehmen. Vielen Dank für die Tipps und Anregungen, Diskussionen und Motivationen sowie die Besuche in Leipzig.

Ein großes Dankeschön gilt auch meinen Freunden, wobei ich besonders Johannes Raschpichler erwähnen möchte, der mit mir für einzigartige Präsentationen und optisch anspruchsvolle Poster unzählige Stunden am Computer verbrachte. Vielen herzlichen Dank auch an

Babett Baraniec, Alexandra Lenschow und Dr. Sebastian Luci für das Korrekturlesen des Manuskripts, wertvolle Tipps und die vielen Aufmunterungen und Motivationshilfen. Ein sehr großes Danke auch an Sabine und Nancy Schmieder, die sich während der Promotionszeit so liebevoll um unsere Pferde gekümmert haben.

Meinem Mann Markus danke ich außerordentlich für seine Geduld, seine super funktionierende Computer-Notfall-Hotline und einfach dafür, dass es ihn gibt. Meinen Eltern, Großeltern und meiner Schwester danke ich für die seelische, moralische und auch vielfach finanzielle Unterstützung, das Korrekturlesen und die fortwährende Erinnerung an das schlechte Gewissen. Danke, dass Ihr immer für mich da seid.

– HERZLICHEN DANK! –

12 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

12.1 *Publikationen*

Gemeinhardt A., Alfalah M., Gück T., Naim H.Y., Fuhrmann H. (2009): The influence of essential fatty acids on activity and intracellular localisation of phospholipase D in COS-1 cells. *Biological Chemistry*, 390 (3): 253-258.

Köhler C., Gemeinhardt A., Thielebein J., Fuhrmann H. (2006): Geschlechtsbestimmung beim Lachenden Hans (*Dacelo gigas*) mittels Polymerasekettenreaktion. *Tierärztliche Praxis*, 34 (1): 55-58

12.2 *Vorträge*

Interdisziplinäres Kolloquium (14.01.2006)

Gemeinhardt A., Alfalah M., Gück T., Fuhrmann H. Der Einfluss von Mastoparan auf die intrazelluläre Lokalisation der Phospholipasen D1 und D2 in verschiedenen Zelllinien.

Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) in Gießen, Fachgruppe Physiologie & Biochemie (19.02. – 21.02.2006)

Gemeinhardt A., Alfalah M., Gück T., Fuhrmann H. Der Einfluss von Mastoparan auf die intrazelluläre Lokalisation der Phospholipasen D1 und D2 in verschiedenen Zelllinien.

12.3 *Buchbeiträge*

Von Hörsten S., Krahn M., Frerker N., Gemeinhardt A., Schwab D., Slesiona S., Naim H., Alfalah M. (2006): Intestinal apical protein transport in health and disease. In: *Proteases in gastrointestinal tissues*. Lendeckel U, Hooper N. M. (eds.), 13: 315-338, Springer-Verlag, Dordrecht, Netherlands

12.4 *Poster*

XV Lipid Meeting in Leipzig (06.12. – 08.12.2007)

Gemeinhardt A., Alfalah M., Gück T., Fuhrmann H. The effect of essential fatty acids on the activity and intracellular trafficking of phospholipase D in COS-1 cells. PP42

Tagung der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) in Göttingen (2007)

Gemeinhardt A., Alfalah M., Gück T., Fuhrmann H. Die Wirkung essentieller Fettsäuren auf die Aktivität und des intrazellulären Transport der Phospholipase D in COS-1-Zellen. Proc. Soc. Nutr. Physiol., 16.

Tagung der European Life Scientist Organization (ELSO) in Dresden (05.09. – 07.09.2005)

Gemeinhardt A., Alfalah M., Gück T., Fuhrmann H. Mastoparan mediates the targeting of PLD1 to the plasma membrane in different cell lines. PSG 221